

SÉRIE A. N° 3338

N° D'ORDRE :

4210

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis-René REY

PREMIÈRE THÈSE

ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE ET PHYSICOCHEMIE
DE L'ACTION DES BASSES TEMPÉRATURES
SUR LES TISSUS ANIMAUX VIVANTS.
APPLICATION AU CŒUR DE L'EMBRYON DE POULET
ET A LA PEAU DE LA SOURIS ET DU RAT

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION

Soutenues le 4 juillet 1958 devant la Commission d'examen

M. PRENANT

Président

M. WURMSER

M^{lle} LE BRETON

Examineurs

HERMANN

1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545923_0003

SÉRIE A. N° 3338

N° D'ORDRE :

4210

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis-René REY

1^{re} THÈSE. — ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET PHYSICOCHIMIQUE DE L'ACTION DES BASSES TEMPÉRATURES SUR LES TISSUS ANIMAUX VIVANTS. APPLICATION AU CŒUR DE L'EMBRYON DE POULET ET A LA PEAU DE LA SOURIS ET DU RAT.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté. L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION.

Soutenues le 4 juillet 1958 devant la Commission d'examen

M. PRENANT

Président

M. WURMSER

M^{lle} LE BRETON

Examineurs



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

DOYEN : J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LUCAS	T	Recherches physiques.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	ARNULF	T	Optique appliquée.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	M. MORAND	T	Enseignement de Physique.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	SOLEILLET	T	Physique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	DANJON	T	Astronomie.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
M. CURIE	T	Physique (S. P. C. N.).	JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	PETIT	T	Biologie maritime.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique Mathématique.	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	GALLIEN	T	Embryologie.
PLANTEFOL	T	Botanique.	EICHORN	T	Biologie végétale (S. P. C. N.).
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	DE CUGNAC		Biologie végétale (S. P. C. N.).
PRÉVOST	T	Chimie organique.	Mlle CAUCHOIS	T	Chimie Physique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	THELLIER	T	Physique du Globe.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	L'HÉRITIER	T	Génétique.
WYART	T	Minéralogie.	GRIVET	T	Radioélectricité.
TEISSIER	T	Zoologie.	PONCIN	T	Mécanique générale.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	QUELET	T	Chimie organique.
MONNIER	T	Physiologie générale.	GAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	JUNG	T	Pétrographie.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
FAVARD	T	Géométrie supérieure	WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.
COULOMB	T	Physique du Globe.	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (S. P. C. N.).	VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	DESTOUCHES		Théories physiques.
P. DRACH	T	Zoologie.	M. PRUVOST	T	Géologie.
KASTLER	T	Physique.	AMIEL	T	Chimie générale.
EPHRUSSI	T	Génétique.	HOCART	T	Minéralogie.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	J.-P. MATHIEU	T	Physique (P. C. B.).
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.).	COUTEAUX	T	Biologie animale (P. C. B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P. C. B.).			

MAY	T	Biologie animale (P. C. B.).	SOUCHAY	Chimie générale (P. C. B.).
CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.	AIGRAIN	Physique (P. C. B.).
FELDMANN	T	Biologie (P. C. B.).	BRUSSET	Chimie minérale.
GUINIER	T	Physique des solides.	M. LÉVY	Physique théorique.
JOST	T	Physiologie comparée.	LENORMANT	Physiologie.
FORTET	T	Calcul des probabilités.	Mme CHAIX	Chimie biologique.
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral.	Mme HUREL-PY	Biologie végétale (P. C. B.).
CHOUARD	T	Physiologie végétale.	PIAUX	Chimie (P. C. B.).
MALAVARD	T	Aviation.	BRUN	Mécanique expérimentale des fluides.
BRELÔT	T	Calcul différentiel.	LEDERER	T Chimie biologique.
NORMANT	T	Chimie organique.	Mme DUBREIL	T Mathématiques.
BÉNARD	T	Chimie (P. C. B.).	Mme LE LONG	T Mathématiques (E. N. S.).
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).	BELLAIR	Géologie (S. P. C. N.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.	COTTE	T Physique (M. P. C.).
GELOSO	T	Chimie (S. P. C. N.).	J.-E. DUBOIS	T Chimie (S. P. C. N.).
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.	LAMOTTE	Zoologie (E. N. S.).
ULRICH	T	Physiologie végétale.	MICHEL	T Chimie (S. P. C. N.).
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.	OLMER	T Energétique générale.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.	ROUAULT	T Physique générale.
CHADEFAUD		Botanique.	GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
DESTRIAU	T	Physique (M. P. C.).	BARCHEWITZ	Chimie physique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie générale.	BROSSEL	Physique atomique.
SALEM	T	Mathématiques générales.	BUSER	Biologie animale (P. C. B.).
LELONG	T	Mathématiques générales.	CAMUS	Biologie végétale (P. C. B.).
DEVILLERS		Anatomie et Histologie comparées.	CASTAING	Physique générale.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.	CURIEN	Minéralogie et Cristallographie.
FRANÇON		Physique (S. P. C. N.).	MOYSE	Physiologie végétale.
GLANCEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	NOIROT	Evolution des êtres organisés.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. P. C.).	PANNETIER	Chimie (P. C. B.).
PISOT	T	Calcul des Probabilités.	POSSOMPES	Biologie animale (P. C. B.).
E. ROCH	T	Géologie.	PULLMANN	Chimie théorique.
SCHATZMANN		Astrophysique.	TEILLAC	Physique nucléaire et Radioactivité.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.	TONNELAT	Biologie physicochimique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.	VILLE	Econométrie.
JOLIOU	T	Physique nucléaire et Radioactivité.	WILLEMART	Chimie (P. C. B.).
LENNUIER		Physique (P. C. B.).	DODÉ	Chimie.
RIZET		Génétique.	FREYMAN	Physique (S. P. C. N.).
ROUTHIER		Géologie appliquée.	GUINCHET	Biologie végétale (Orsay)
Mme TONNELAT		Théories physiques.	ROLLET	Chimie (P. C. B.).
DIXMIER		Mathématiques (M. P. C.).	Mlle JOSIEN	Chimie (P. C. B.).
			CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
			DESNUELLE	T Chimie biologique.

Secrétaire général: C. MONIER

A la mémoire de mon Maître,
le Professeur Robert LÉVY
Professeur à l'Ecole Normale Supérieure
et à la Faculté des Sciences de Paris
Officier de la Légion d'honneur

Son attention bienveillante, son aide affectueuse et soutenue, la remarquable clarté de son enseignement m'ont permis de concevoir et de réaliser ce travail. Au cours des années où j'ai eu le bonheur de travailler sous sa direction, je n'ai jamais cessé de bénéficier de l'atmosphère d'enthousiasme et de compréhension que l'exceptionnelle valeur de ses qualités intellectuelles et humaines lui permettait d'entretenir autour de lui. Je voudrais que ce travail soit un modeste et très respectueux hommage à sa mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
CHAPITRE 1. PROBLÈMES DE TECHNIQUE : PRODUCTION, MESURE ET UTILISATION DES BASSES TEMPÉRATURES.	10
I. <i>Sources de froid utilisables au laboratoire.</i>	10
II. <i>Méthodes de mesure et de contrôle des températures</i>	16
III. <i>Techniques de congélation et de dégel des tissus et organes.</i>	17
CHAPITRE 2. ETUDE EXPÉRIMENTALE DE L'ACTION DES BASSES TEMPÉRATURES SUR LE TISSU CARDIAQUE DE L'EMBRYON DE POULET.	23
I. <i>Techniques de cultures.</i>	23
II. <i>Croissance in vitro du tissu cardiaque normal.</i>	27
III. <i>Histophysiologie du tissu cardiaque soumis à l'action des basses températures</i>	31
CHAPITRE 3. PHYSIOLOGIE DU CŒUR DE L'EMBRYON DE POULET IN VITRO APRÈS CONGÉLATION A TRÈS BASSES TEMPÉRATURES	43
I. <i>Techniques</i>	45
II. <i>Comportement in vitro du cœur de l'embryon de poulet.</i>	49
1. <i>Cœurs témoins non congelés.</i>	49
2. <i>Cœurs congelés</i>	50
CHAPITRE 4. LA SURVIE DE LA PEAU APRÈS EXPOSITION AUX BASSES TEMPÉRATURES. EXPÉRIENCES DE GREFFES CHEZ LE RAT ET LA SOURIS	59
I. <i>Techniques</i>	60
II. <i>Evolution des autogreffes de peau normales et congelées.</i>	64
III. <i>Le problème des homogreffes. Basses températures et pouvoir antigénique.</i>	69
CHAPITRE 5. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DES PROCESSUS DE CONGÉLATION ET DE DÉGEL A L'ÉCHELLE CELLULAIRE.	72
I. <i>Dispositif nouveau pour l'examen microscopique aux basses températures. Construction, fonctionnement et domaine d'utilisation</i>	73
II. <i>Les processus de congélation et de dégel dans les cellules vivantes</i>	81

CHAPITRE 6. LES PREMIÈRES ÉTAPES DU REFROIDISSEMENT. FORMATION ET PROPAGATION DES CRISTAUX DE GLACE.	88
I. <i>Etude de certains aspects théoriques de la cristallisation de l'eau et des systèmes aqueux.</i> . . .	89
II. <i>Etude expérimentale de la propagation de la cristallisation dans les systèmes biologiques au cours du refroidissement initial.</i>	94
CHAPITRE 7. LE PASSAGE DES TEMPÉRATURES INTERMÉDIAIRES. FORMATION ET CRISTALLISATION DES MÉLANGES EUTECTIQUES	107
I. <i>Méthodes d'études.</i>	108
II. <i>Résultats expérimentaux</i>	111
CHAPITRE 8. PHÉNOMÈNES THERMODYNAMIQUES A BASSE TEMPÉRATURE. TRANSFORMATION VITREUSE ET DÉVITRIFICATION.	120
I. <i>La méthode d'analyse thermique.</i>	120
II. <i>Etude expérimentale des transformations de certains systèmes biologiques à basse température.</i>	125
CHAPITRE 9. LE PROCÉDÉ DE CRYODESSICCATION OU LYOPHILISATION. SON APPLICATION AUX PRODUITS BIOLOGIQUES.	137
I. <i>Théorie de la cryodessiccation.</i>	139
II. <i>La cryodessiccation des systèmes biologiques et principalement des tissus animaux</i>	143
III. <i>Appareil expérimental pour lyophilisation à basse température.</i>	146
IV. <i>Premiers résultats expérimentaux.</i>	151
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.	153
I. <i>Etude de la résistance aux basses températures du tissu cardiaque de l'embryon de poulet et de la peau du rat et de la souris. Mise en évidence du rôle protecteur du glycérol.</i> . .	154
II. <i>Etude du mécanisme physico-chimique de la protection apportée par le glycérol</i>	155
BIBLIOGRAPHIE.	159

Parmi les nombreux facteurs qui peuvent influencer la vie des animaux, la température ambiante est certainement l'un des plus importants. Les fluctuations locales ou saisonnières agissent d'une manière profonde sur l'activité physiologique des organismes qui répondent à ce stimulus de différentes manières. Il est classique d'opposer les « poïkilothermes » dont la température interne est variable et proche de la température ambiante, aux « homéothermes » dont la température interne est constante. Les mécanismes assurant l'équilibre thermique sont très complexes et toutes les grandes fonctions de l'organisme y participent. Ceci permet, dans une grande mesure, à la plupart des animaux, de s'adapter à des conditions de température sensiblement différentes et de supporter des variations thermiques importantes du milieu extérieur. Cette faculté d'adaptation a toutefois des limites et l'on peut dire qu'à chaque type de climat correspond une faune associée caractéristique. A l'intérieur d'une région climatique, les variations thermiques s'inscrivent entre des limites précises compatibles avec la vie des animaux qui s'y trouvent. Ces variations peuvent parfois être très importantes, mais elles présentent toujours un caractère graduel et correspondent le plus souvent à une évolution progressive en fonction des saisons.

Malgré la rigueur apparente de cette distribution de la faune terrestre en fonction des conditions climatiques, on constate que la plupart des animaux, à l'exception de ceux qui vivent en milieu aquatique, peuvent néanmoins survivre à des variations exceptionnelles de température beaucoup plus accusées. Ceci, toutefois, ne se fait pas de manière quelconque et l'on constate que, si l'amplitude des variations thermiques a un rôle relativement restreint, la valeur des limites extrêmes entre lesquelles la température peut osciller présente au contraire une très grande importance. En effet, un animal disposant d'eau et ne

subissant pas d'éclairement direct, supporte plus facilement de larges variations thermiques si elles s'inscrivent dans la zone tempérée ou chaude. Peu d'animaux, au contraire, survivent à une durée d'exposition même courte, à des températures de beaucoup inférieures à 0° C. Il existe cependant des régions du globe terrestre où le thermomètre peut s'abaisser jusqu'à — 70° C. Le nord de la Sibérie, le Grand Nord canadien, les Hauts Plateaux de l'Asie centrale, les sommets des chaînes montagneuses récentes et les régions circumpolaires connaissent pendant des mois les rigueurs du froid et le blizzard souffle de façon presque ininterrompue sur un sol désolé où la température est de l'ordre de — 40° C à — 50° C.

Cependant, toute vie n'a pas disparu et divers organismes se sont adaptés à ces conditions rigoureuses, soit qu'ils supportent temporairement un abaissement considérable de leur température interne avec même parfois congélation partielle des liquides péricellulaires et intracellulaires, soit que divers mécanismes physiologiques leur permettent de maintenir constante leur température corporelle malgré le froid extérieur. Il suffit néanmoins d'un faible déséquilibre ou d'une inadaptation même légère pour que s'exercent les effets nocifs d'une perte calorifique trop élevée et c'est alors que survient la mort par le froid.

La résistance au froid de diverses plantes et animaux et de l'homme lui-même, a fait l'objet de très nombreuses études. Plusieurs excellentes monographies ont été consacrées à l'histoire de ces divers travaux. Beleh-Radek [9], Luyet [104] et plus récemment Smith [188], ont montré comment, peu à peu, avaient été élaborées les thèses essentielles concernant les effets physiologiques du froid.

En 1665, Robert Boyle [18] publiait son remarquable ouvrage *New Experiments and Observations touching Cold*. La notion de froid était alors, comme le souligne A. S. Parkes [142], purement subjective et Boyle lui-même était amené à dire : « Il peut apparaître aux hommes comme étant d'une curiosité inutile et d'une diligence superflue que d'entreprendre un travail destiné à examiner avec soin de quelle manière et par quel critère on peut estimer et déterminer le degré de Froid des Corps. En effet, le froid étant une qualité tactile, il semble impertinent de rechercher d'autres juges que les organes des sens dont c'est le propre objet. »

Il fallut attendre le début de la thermométrie pour que de véritables recherches scientifiques soient réalisées. Réaumur [164] qui avait inventé en 1731 un premier thermomètre, se penchait en 1736 sur l'action du froid sur les insectes et quelques années plus tard, en 1776, Spallanzani [196] réussissait à obtenir des températures voisines de — 24° C en ajoutant de l'esprit de nitre à un mélange de neige et de sel gemme. Il découvrit que le papillon et les œufs de ver à soie survivaient à un froid de — 17° C à l'extérieur et — 24° C au laboratoire. Il s'agissait là de cas particuliers. Beaucoup d'organismes en effet supportaient

d'être refroidis de la sorte et déjà en 1766, John Hunter [73, 138] marquait sa déception de ne pouvoir ranimer des carpes après une congélation prolongée.

A la suite de ces premiers investigateurs, d'autres chercheurs continuent tout au long du XIX^e siècle, à étudier les effets biologiques du froid.

Tout d'abord plus particulièrement orientées vers le domaine végétal et l'influence des gelées, avec Du Petit-Thouars [146] en 1817 et Dunal [36] en 1848, les recherches ne tardèrent pas à s'étendre aux groupes animaux. De Quatrefages [163] en 1853 étudie la résistance au froid des poissons d'eau douce, Walther [211] celle des lapins en 1862, puis Pouchet [160] en 1886, Schenk [180], Plateau [149], Pictet [148] etc., multiplient les observations dans les domaines les plus variés.

Parallèlement, les connaissances physiques relatives aux basses températures font d'immenses progrès. Cailletet et Pictet liquéfient l'oxygène en 1877, en 1895 Linde produit l'air liquide en quantité et, en 1898, Dewar liquéfie l'hydrogène.

Depuis lors, la masse des travaux scientifiques consacrés aux problèmes de réfrigération ne fait que s'accroître. Les applications du froid ont débordé le cadre du laboratoire pour s'épanouir largement dans le domaine industriel. Les transports, les industries alimentaires, les industries chimiques, pharmaceutiques, le bâtiment, la construction navale et la chirurgie connaissent les problèmes frigorifiques. L'usage des compresseurs, des échangeurs, des climatiseurs est devenu universel et partout leur utilisation s'accompagne d'un cortège de problèmes physiologiques.

Parmi tous les aspects que l'on peut envisager dans la corrélation du froid et de l'être vivant, nous avons voulu sélectionner un problème particulier et tenter l'étude, et nous voudrions tout d'abord le définir avec précision.

Lorsque l'on envisage les divers degrés de résistance développée contre le froid par les organismes animaux, il est possible de distinguer avec Luyet [104] trois groupes différents.

A l'intérieur du premier groupe, se trouve tout un ensemble d'organismes qui peuvent s'approcher du zéro absolu sans être tués. Ce sont d'une part les formes qui supportent un degré élevé de déshydratation telles que les spores, les protozoaires enkystés, les rotifères, les tardigrades et les nématodes. Les remarquables travaux de Becquerel [6] ont montré qu'il était possible de les refroidir jusqu'à une température de 0,0075° K sans altérations. Un certain nombre de microorganismes d'autre part, comme divers flagellés, de même que les bactéries, les levures et les champignons inférieurs dans le règne végétal, résistent aux très basses températures sans déshydratation préalable. Les travaux de Klebs [81] sur l'euglène en sont un exemple.

Dans le deuxième groupe, qui réunit la majeure partie des animaux, se

trouvent tous les organismes qui meurent à des températures voisines de 0° C. Certains d'entre eux sont tués dès que leur température interne est abaissée légèrement en dessous du point de fusion et ne peuvent résister à une cristallisation étendue. Borodin [17] puis Kalabuchov [77] en étudiant les poissons ont constaté que le degré de survie diminuait au fur et à mesure que la cristallisation était plus complète et qu'un durcissement de la surface du corps seulement était compatible avec une reprise de l'activité vitale.

D'autres animaux, au contraire, peuvent tolérer une congélation presque totale et la majeure partie de l'eau de leurs tissus peut cristalliser sans danger. Il s'agit principalement des larves d'insectes qui ont fait l'objet de recherches étendues menées par de nombreux auteurs comme Duval et Portier [37], Sacharov [176], Kalabuchov [77] etc... On peut refroidir ces larves à 10, 20 ou 30° en dessous de 0° C, mais cependant une cristallisation totale consécutive à une exposition à des températures beaucoup plus basses n'est plus suivie de réanimation. Il faut par contre, invoquer des mécanismes très différents pour expliquer la mort due au froid à l'intérieur du troisième groupe de Luyet [104]. En effet, la mort survient alors à des températures supérieures à 0° C. Il s'agit là des homéothermes. Un faible abaissement de la température centrale est suffisant pour provoquer la mort et pendant très longtemps on a considéré comme parfaitement prouvé que les mammifères adultes d'espèces non hibernantes ne pouvaient survivre si leur température interne s'abaissait en dessous de 14° à 20° C (Burton et Edholm [28]).

Depuis lors, les idées ont beaucoup évolué dans ce domaine. Lorsque l'on a pu contrôler les processus du refroidissement soit par voie pharmacodynamique (Laborit) soit par voie physiologique (Giaja, Andjus), il a été possible de maintenir des mammifères soit en état d'hibernation artificielle avec un abaissement de la température corporelle vers 28° C, soit en état d'hypothermie profonde lorsque la température corporelle descend en dessous de 10° C. Il a même été possible de provoquer un arrêt total des phénomènes circulatoires et respiratoires, tout en gardant la possibilité de survie. (Andjus [2]). Ces recherches ont donné lieu à de remarquables applications chirurgicales et les procédés de réanimation d'individus en état de mort physiologique apparente ont pu être étendus à l'homme (Negovski [125]).

Récemment enfin, les travaux fondamentaux de A. U. Smith [189, 190] ont montré que, dans certains cas, la température centrale pouvait s'abaisser jusqu'à des valeurs telles, que 40 % de l'eau corporelle se trouvait cristallisée tout en permettant une reprise totale d'une activité vitale normale après dégel.

Parallèlement à ces travaux consacrés aux organismes entiers, de nombreuses recherches ont porté sur la résistance au froid d'organes ou de cellules isolés. Les divers auteurs ont recherché des conditions optima de congélation et de dégel

qui puissent permettre une survie appréciable. Des études précises réalisées sur ce matériel cellulaire ont permis de concevoir d'une manière plus exacte, le mode d'action du froid sur l'organisme entier. Elles présentent de plus, en dehors de leur intérêt purement spéculatif, un champ d'applications d'une très grande importance pratique. En effet, grâce à la conservation par le froid, devient réalisable la création de « banques de tissus » où divers types d'organes peuvent être gardés à basse température pour devenir immédiatement utilisables lors d'une urgence chirurgicale.

Ainsi se trouvait réalisé le rêve d'Alexis Carrel, soulignant à Atlantic City en 1912, devant la section de chirurgie de l'American Medical Association, combien il serait important pour les chirurgiens de pouvoir disposer à tout moment, d'un stock de tissus et de greffons conservés pour répondre à tous les cas urgents.

Seul l'emploi de températures très basses peut permettre à la fois une conservation de longue durée du tissu et le maintien d'une activité physiologique normale après dégel. Le but de notre travail a été d'étudier la résistance aux basses températures des tissus et organes et nous avons cherché à expliquer par la physico-chimie, les résultats de nos expériences physiologiques. Nous avons voulu en terminant envisager l'application de certains résultats théoriques à des problèmes pratiques touchant à la « Banque de tissus » et à la conservation de produits naturels, en étudiant le procédé de lyophilisation.

Problèmes de technique. Production, mesure et utilisation des basses températures

Avant d'aborder l'étude de la physiologie des tissus et organes soumis à l'action des basses températures, nous avons voulu nous arrêter quelques instants sur des problèmes de technique.

Le terme de *basses températures* est relativement mal défini et il est nécessaire, pour bien délimiter notre problème, de lui donner une signification précise. Pour le climatologue, -20°C représente une température basse et le physiologiste qui s'occupe d'hibernation a tendance à considérer une température interne de $+25^{\circ}\text{C}$ comme déjà très basse. Un ingénieur frigoriste ou un agronome donneront du froid des définitions très différentes, et l'on peut dire que la zone des températures « normales » varie avec chaque discipline scientifique.

Pour établir une échelle thermique de référence, nous avons adopté dans le domaine des *basses températures*, un point de vue très proche de celui de la physique classique. Nous distinguons alors : les températures élevées : proches de 0°C ; les températures moyennement basses, appelées également températures intermédiaires : de -20°C à -80°C ; les températures basses : de -80°C à -150°C ; les températures très basses : de -150°C à -272°C .

Dans ce dernier domaine nous nous sommes d'ailleurs limités à la température de l'azote liquide bouillant sous la pression atmosphérique normale (760 mm Hg), c'est-à-dire que nous n'avons réalisé aucune expérience en-dessous de -196°C .

I. Sources de froid utilisables au laboratoire

Les mélanges ou systèmes réfrigérants que nous avons utilisés nous ont permis d'obtenir toutes les températures comprises entre $+40^{\circ}\text{C}$ et -200°C . Pour cela, nous avons fait appel à trois sources de froid classiques que l'industrie

met directement à la disposition des laboratoires : la glace, la neige carbonique et l'azote liquide.

1. LA GLACE

A 0°C , en présence de germes cristallins, l'eau se transforme en glace avec libération de chaleur. La glace cristallise dans le système hexagonal pour donner des cristaux biréfringents et uniaxes. Les travaux de Bridgman ont montré qu'il existe diverses variétés de glace et que leur structure dépend de la température et de la pression environnantes. Dans les conditions habituelles (0°C , 760 mm Hg), on obtient la glace I de densité 0,91.

Nous avons principalement utilisé la glace pour obtenir une température de référence commode et stable.

2. LA NEIGE CARBONIQUE

Le gaz carbonique, CO_2 , qui fait l'objet d'une exploitation industrielle très importante, peut s'obtenir sous de nombreuses formes. A l'état solide, il constitue un produit blanc, rigide, appelé neige carbonique, carboglace ou carbopoudre, dont la densité est de 1,56 à -78°C . A la pression ordinaire, ce corps ne redevient pas liquide et se sublime spontanément à une température fixe égale à $-78,5^{\circ}\text{C}$.

Par suite de sa chaleur spécifique peu élevée et du mauvais degré de contact qu'elle peut assurer, nous n'avons utilisé la neige carbonique seule que dans quelques cas particuliers. Dans la plupart des expériences, elle nous a servi à refroidir des bains d'alcool éthylique ou d'acétone. Il est ainsi possible d'obtenir toutes les températures intermédiaires entre -78°C et 0°C , en déterminant soigneusement la quantité de neige carbonique à ajouter au bain liquide.

Toutefois si l'on veut réaliser des refroidissements très rapides à -78°C , il est nécessaire d'opérer avec une double enveloppe et de refroidir de l'alcool pur contenu dans un bain central par un manchon réfrigérant externe rempli du mélange alcool - glace carbonique en excès. En effet, une quantité très importante de gaz carbonique se dissout dans l'alcool du bain et, au contact d'un corps chaud, il se produit un dégazage interne qui retarde considérablement le refroidissement.

3. L'AZOTE LIQUIDE

Depuis la fin du XIX^{e} siècle, les procédés de Georges Claude et de Carl von Linde ont permis la liquéfaction de l'air et la séparation à l'état liquide de ses principaux constituants. Nous avons, dans nos recherches, utilisé l'azote liquide. L'air

liquide, en effet, n'étant pas un corps pur, ne bout pas à température fixe. Quant à l'oxygène, il donne un liquide bleu indigo, très mobile, mais relativement instable et très vésicant.

A. Utilisation directe

L'azote liquide se présente sous la forme d'un fluide transparent, incolore, de densité 0,808 et qui bout à la température de $-195,8^{\circ}\text{C}$. Il se conserve facilement dans un vase Dewar et c'est ainsi que nous l'avons utilisé directement dans la plupart de nos expériences. En le faisant bouillir sous pression réduite, il est possible d'atteindre des températures inférieures à -200°C . C'est à titre de curiosité seulement, que nous avons fabriqué de l'azote solide à une température voisine de -220°C .

B. Utilisation indirecte

a) Le propane liquide. En dehors de son utilisation directe, nous avons également employé l'azote liquide pour refroidir d'autres corps. En effet, l'azote liquide étant un liquide à son point d'ébullition, assure un très mauvais contact thermique avec les objets que l'on y plonge. Citons en exemple, qu'il est facile d'y tremper la main sans danger. Lorsque l'on immerge un corps dans l'azote liquide, il se produit une ébullition très violente et la surface du corps se trouve entourée d'une enveloppe d'azote gazeux. Il s'agit d'un phénomène de caléfaction qui protège le spécimen et diminue de façon considérable la vitesse de refroidissement. Nous avons pu montrer que c'est à la température de -140 à -150°C seulement que le contact s'améliore brutalement et que l'azote liquide mouille le corps (p. 124, figure 64).

Pour éviter ces inconvénients, on a recherché des liquides qui pourraient servir d'intermédiaires entre l'azote liquide et le spécimen à refroidir. L'alcool éthylique et l'acétone ont été éliminés par suite de leur température de fusion trop élevée ($-117,3^{\circ}\text{C}$; -95°C). De nombreux auteurs dont Luyet [101] préconisent l'emploi de l'isopentane (2 — méthylbutane). C'est un liquide transparent et incolore, de densité 0,621 (à 19°C), qui bout à 28°C et se solidifie vers $-160,5^{\circ}\text{C}$. On le refroidit, tout en l'agitant, par un bain périphérique d'azote liquide. Lors de l'immersion d'un corps dans l'isopentane froid, il ne se produit aucune ébullition et la chute de température est très rapide.

Nous avons utilisé l'isopentane au début de nos recherches, mais nous l'avons abandonné parce qu'il devenait solide en dessous de $-160,5^{\circ}\text{C}$ et qu'il était très difficile de définir sa température de façon précise. Nous avons employé à sa place le propane liquide qui ne semble pas avoir été utilisé dans ce but par d'autres chercheurs. Seul Meryman [118] signale l'emploi du propane liquide mais ne fournit aucune explication à son sujet.

Le propane pur est un gaz à odeur forte qui se liquéfie facilement. Le liquide bout à $-42,17^{\circ}\text{C}$ et se solidifie à $-187,1^{\circ}\text{C}$. Sa densité est de 0,58 (à $-44,5^{\circ}\text{C}$). Il ne convient donc pas parfaitement puisqu'il se solidifie à 9°C au-dessus de la température d'ébullition de l'azote liquide. Nous avons alors employé un propane commercial contenant 4 % d'éthane et 0,6 % de butane. Ce gaz se liquéfie vers -45°C et il est encore parfaitement liquide à -196°C . C'est un fluide transparent et incolore très mobile. Des mesures de densité nous ont donné le chiffre de 0,75 (à -189°C).

La figure 1 montre l'appareillage utilisé pour préparer le propane liquide.

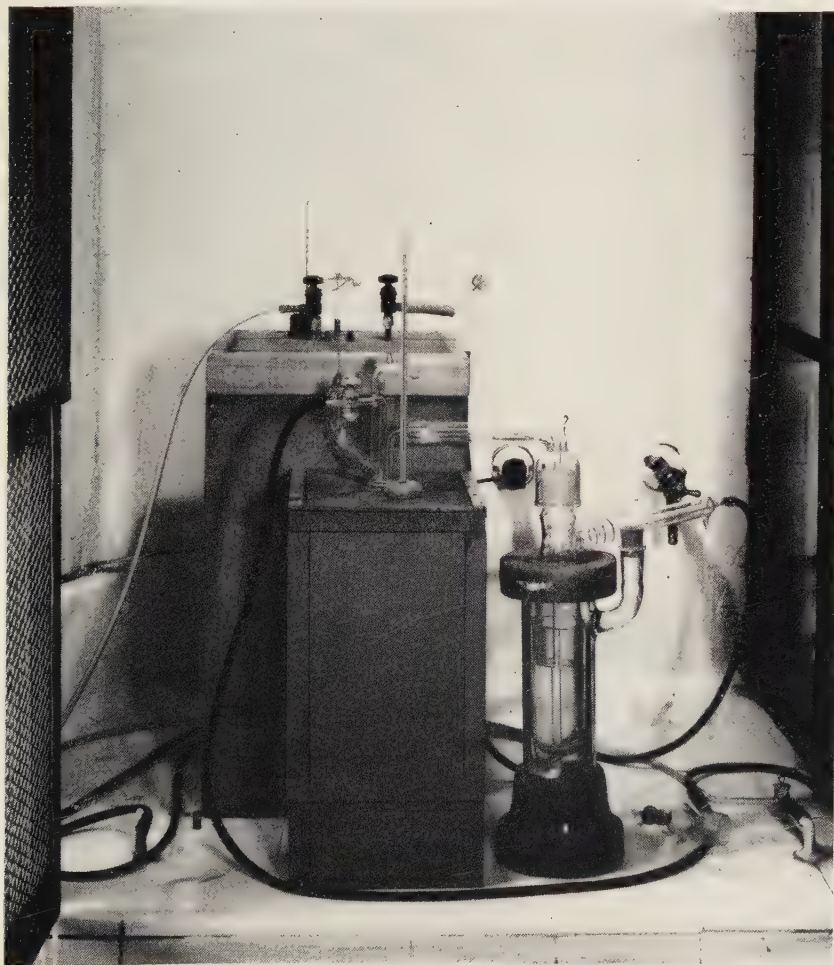


Figure 1. Appareil utilisé pour la fabrication de propane liquide à partir de propane commercial gazeux.

Le gaz comprimé dans une bouteille est admis sous une pression de 0,500 kg dans un condenseur constitué par un serpentín et une enceinte d'acier inoxydable plongés dans un mélange réfrigérant alcool éthylique — neige carbonique, vers -75°C . Le propane se liquéfie. Il est ensuite soutiré par pression et refroidi sous atmosphère d'hydrogène jusqu'à -196°C par un bain périphérique d'azote liquide. Il est nécessaire de le maintenir alors sous atmosphère d'hydrogène pour éviter que l'oxygène de l'air ne vienne s'y condenser. Ce mélange est particulièrement instable et violemment explosif.

A la température de l'azote liquide, le propane est à 150°C de son point d'ébullition. Il ne donne pas de phénomène de caléfaction et le mouillage est parfait. La figure 2 en fournit un exemple et permet de comparer azote liquide et propane liquide. La température du thermo-couple s'abaisse de 0°C à -196°C , en 0,5 s dans l'azote liquide soit environ de 400°C/s . Dans le propane liquide, la durée de refroidissement est réduite à 0,05 s, soit une chute de température d'environ 4.000°C/s .

b) *Enceinte thermostatique pour très basses températures.* L'azote liquide ou le propane liquide entouré d'azote liquide, donnent sans difficulté la température de -196°C . Nous avons vu que la neige carbonique permettait d'obtenir $-78,5^{\circ}\text{C}$. Comment obtenir alors des températures intermédiaires ? Ceci est difficile et de nombreux systèmes différents ont été proposés. Nous avons réalisé dans ce but, avec J. Moenier, un cryostat pourvu d'un système de régulation électronique automatique qui permet d'obtenir toutes les températures comprises entre 0°C et -160°C , à $0,01^{\circ}\text{C}$ près.

Refroidissement d'un thermocouple

Cuivre-constantan de 0,6 mm d'épaisseur

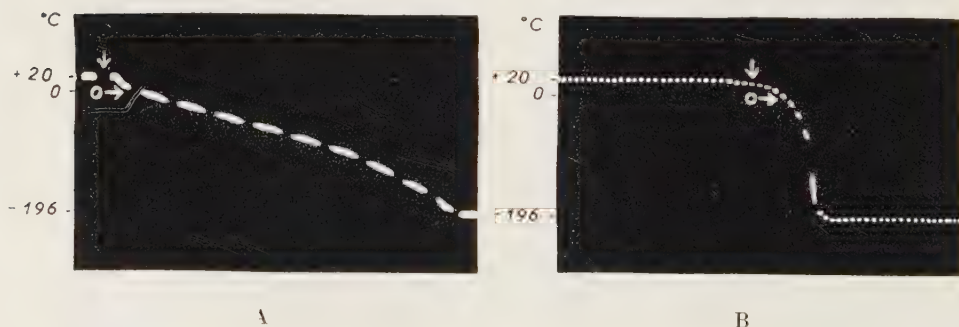


Figure 2. Evaluation des pouvoirs réfrigérants respectifs de l'azote liquide et du propane liquide à -196°C . Les températures sont portées en ordonnées et le temps en abscisses. Relevé oscillographique avec marquage du temps par modulation basse fréquence. A. Propane liquide. 1 trait correspond à 1,20 seconde. — B. Azote liquide. — 1 trait correspond à 1 100 seconde.

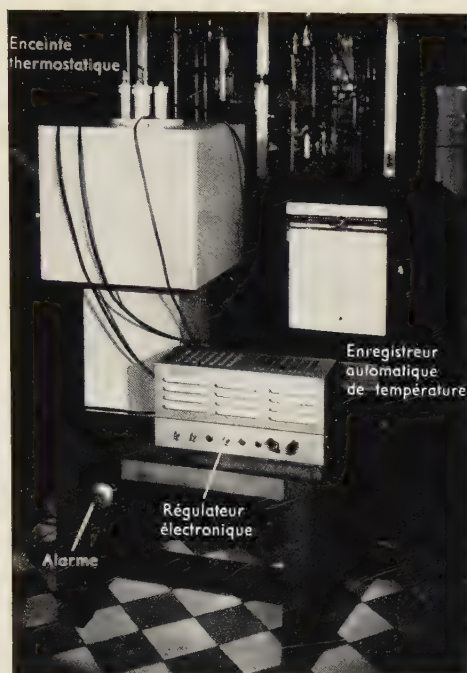


Figure 3. Vue générale de l'enceinte thermostatique utilisée pour obtenir des températures stables entre 0°C et -150°C .

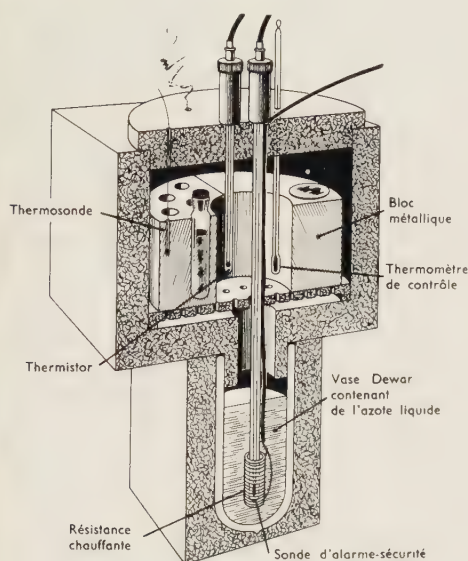


Figure 4. Plan détaillé de l'enceinte thermostatique.

La figure 3 montre une vue d'ensemble du dispositif et la figure 4 donne un schéma de fonctionnement. L'enceinte est constituée par un espace cubique calorifugé par une épaisse paroi de Klegecell et contenant des masses métalliques annulaires qui servent à la fois de volant thermique et de supports aux préparations. Cette enceinte communique par un conduit cylindrique étanche avec un vase Dewar contenant de l'azote liquide et où plonge une résistance électrique chauffante. En période de fonctionnement, cette résistance est sous tension et provoque l'ébullition de l'azote liquide. L'azote gazeux froid s'échappe par le conduit cylindrique et pénètre dans l'enceinte où il est divisé en de nombreux filets par une grille isolante. L'enceinte se refroidit jusqu'à la température voulue, repérée d'une part par le thermomètre, et d'autre part par la thermosonde. Le thermistor se trouvant dans l'enceinte est également refroidi, et, lorsque la température désirée est atteinte, il agit sur le régulateur qui coupe le courant dans la résistance par l'intermédiaire d'un relai.

Les faibles fuites thermiques suffisent alors à réchauffer progressivement l'enceinte et, dès que la température s'est élevée de un ou deux dixièmes de degré,

l'appareil se déclenche et un nouveau flux d'azote froid est envoyé dans l'enceinte. De cette manière, la température ne varie que de quelques dixièmes de degré dans l'atmosphère de l'enceinte. Par contre, si l'objet est placé sur les supports métalliques ou s'il a une certaine taille (quelques millimètres), sa masse calorifique constitue un petit volant thermique et amortit les variations de température, qui deviennent de l'ordre du centième de degré.

L'appareillage peut fonctionner de façon continue. Cinq thermistors différents sont nécessaires pour couvrir la gamme de températures de 0°C à -160°C . Une enceinte de plus petite taille permettrait, au prix d'une forte dépense en azote liquide, de descendre en dessous de -160°C . Nous avons préféré le faire en utilisant un bain de propane liquide, refroidi préalablement à -190°C , et que l'on porte ensuite, par un chauffage modéré, à la température désirée.

La neige carbonique et l'azote liquide nous permettent donc d'obtenir toutes les températures entre 0°C et -190°C . Pour pouvoir réaliser des expériences reproductibles il était nécessaire de disposer de méthodes très précises de mesure et de contrôle des températures obtenues.

II. Méthodes de mesure et de contrôle des températures

I. MESURE DES TEMPÉRATURES

La mesure des températures se fait soit à l'aide de thermomètres, soit à l'aide de thermosondes.

A. Thermomètres

Nous avons utilisé pour les températures élevées, des thermomètres à mercure au $1/10^{\circ}\text{C}$. Toutefois leur emploi devient impossible en dessous de $-38,9^{\circ}\text{C}$ (congélation du mercure). Pour les basses températures et les températures moyennes, nous avons employé des thermomètres à toluène. Certains d'entre eux (au $1/10^{\circ}\text{C}$) ont été réalisés spécialement pour nous et ils ne couvrent chacun qu'une partie de l'échelle des températures (0°C à -20°C , -20°C à -40°C , -40°C à -60°C , -60°C à -80°C , -80°C à -100°C). Des thermomètres à pentane ou à isopentane ont pu être employés jusqu'à -190°C . (Le pentane ou l'isopentane peuvent en effet rester à l'état de surfusion dans les tubes capillaires.) L'étalonnage et la vérification de ces thermomètres ont été réalisés grâce à certains points fixes qui ont servi de repères (glace fondante — fusion du mercure — fusion du sulfure de carbone).

B. Thermosondes

De préférence aux thermomètres, nous avons employé les couples thermo-électriques, cuivre-constantan et fer-constantan. Ils ont été comparés à un couple de référence plongé dans la glace fondante excepté dans les appareils où la compensation de soudure froide est automatique.

2. ENREGISTREMENT DES COURBES DE VARIATIONS DE LA TEMPÉRATURE

Pour suivre l'évolution des phénomènes thermiques, nous avons enregistré la température en fonction du temps. Selon la vitesse de variation de la température, nous avons utilisé divers dispositifs. La notion de rapidité d'une variation thermique demande d'ailleurs à être précisée. Nous avons adopté à cet égard les échelons suivants, en fonction de la durée du phénomène thermique :

<i>Variation</i>	<i>Durée du phénomène</i>
très lente	supérieure à 3 mn
lente	1 à 3 mn
rapide	10 s à 1 mn
très rapide	1 s à 10 s
ultra-rapide	inférieure à 1 s

Ces échelons successifs sont voisins de ceux définis par Luyet [104] et Smith [188].

A. Enregistrement des variations très lentes, lentes et rapides

Nous avons utilisé un pyromètre-potentiomètre enregistreur automatique à 6 directions (visibles sur la figure 3). Un dispositif de commutation électronique permet de changer de direction toutes les 3 secondes. Entre deux pointés successifs sur la même direction, il s'écoule donc 18 secondes. Si l'on désire effectuer des pointés plus fréquents, on peut réunir entre elles plusieurs directions.

B. Enregistrement des variations très rapides et ultra-rapides

Le montage que nous avons réalisé est représenté par la figure 5. Il est semblable dans sa conception à celui qui a été décrit par Luyet [101]. La tension qui s'établit aux bornes d'un thermocouple est appliquée après amplification entre les plaques verticales d'un oscillographe cathodique. Entre les plaques horizontales, on établit une tension alternative en dents de scie donnant un balayage de fréquence connue. Pour éviter toute erreur de parallaxe, le temps est repéré sur la courbe elle-même. Dans ce but on module le faisceau électronique par un courant basse fréquence appliqué au Wehnelt. La courbe de variation thermique s'inscrit directement sur l'écran que l'on photographie. La figure 4 donne un exemple de graphique obtenu par cette méthode qui permet d'enregistrer des variations de température inférieures au 100 millionième de seconde.

III. Techniques de congélation et de dégel des tissus et organes

Les méthodes que nous venons de décrire, nous ont permis de soumettre des tissus à l'action des basses températures dans des conditions bien définies et

aisement reproductibles. Avant d'envisager de manière plus précise quelles ont été les techniques que nous avons utilisées, nous allons étudier rapidement l'aspect théorique du problème.

1. ASPECTS THÉORIQUES DES ÉCHANGES THERMIQUES

L'évolution thermique d'un objet immergé dans un bain à température constante est fort complexe. Elle dépend principalement de la nature de l'objet, de la nature du bain et du degré de contact qui s'établit entre eux.

La chaleur spécifique du corps, sa conductibilité thermique, sa structure et sa taille sont autant de facteurs qui modifient le transfert de chaleur. Dans le cas particulier de nos expériences, les divers tissus présentent de grandes analogies et c'est principalement leur taille qui intervient. En effet, lorsque l'on refroidit un fragment de tissu, la température n'est pas uniforme dans toute sa masse. Le centre a tendance à se refroidir plus lentement et jusqu'à l'établissement de l'équilibre, le tissu est le siège de gradients thermiques qui peuvent être considérables. La taille du fragment de tissu a donc un rôle très important. Dans notre

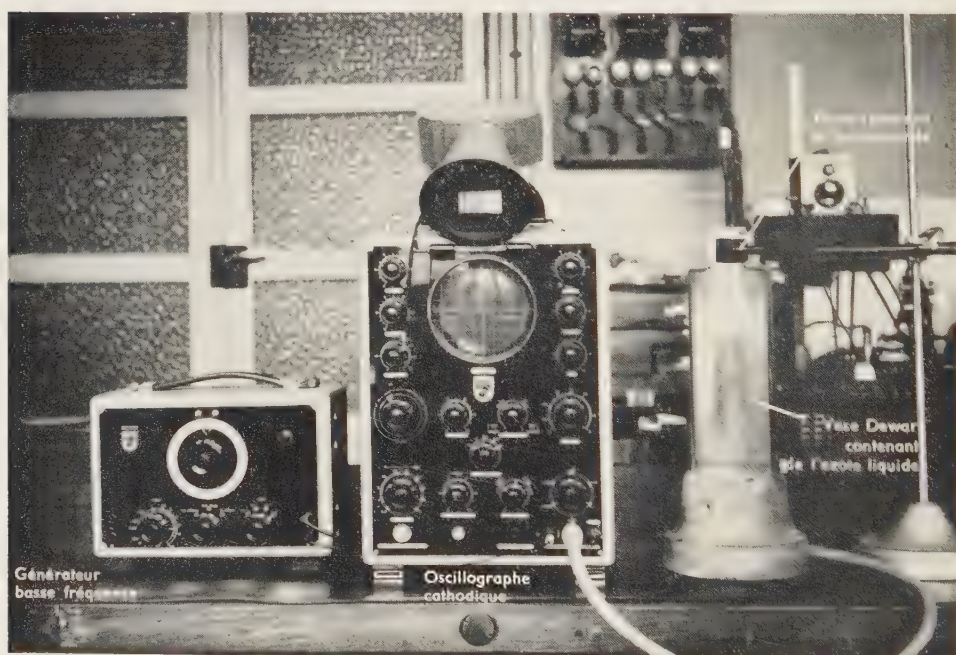


Figure 5. Montage utilisé pour enregistrer les variations rapides de températures. La courbe de refroidissement d'un spécimen plongé dans l'azote liquide est visible sur l'écran de l'oscillographe cathodique. Elle est modulée par un générateur basse fréquence.

travail, nous nous sommes limités à des objets très petits dont l'épaisseur n'a jamais excédé 5 mm.

La nature du bain réfrigérant intervient également comme nous l'avons vu précédemment. Le refroidissement est d'autant plus rapide que la différence de température entre le bain et le tissu est plus grande. La température varie alors de façon exponentielle et l'équilibre final est assez long à atteindre. La loi de Newton traduit ceci sous forme mathématique dans le cas idéal où l'objet de surface A , de masse m , de chaleur spécifique s , possédant une conductivité thermique C , est parfaitement isotrope, qu'il est entouré de tous côtés par le bain réfrigérant, que le contact thermique est parfait et qu'aucune chaleur ne s'échappe par radiation ou convection. La température au temps z est donnée par la relation :

$$\theta_z = \theta_1 + (\theta_0 - \theta_1) e^{-\frac{AC}{ms} z}$$

ou θ_0 représente la température à l'instant 0, et θ_1 la température du bain réfrigérant.

La formule de Newton ne s'applique évidemment qu'à des cas très particuliers. En effet, le degré de contact thermique entre le bain réfrigérant et l'objet varie considérablement d'une source de froid à l'autre. Nous avons vu au début de ce chapitre, que l'azote liquide et le propane liquide se comportent à cet effet de manière très différente. Nous avons d'ailleurs utilisé ces différences pour mettre au point des techniques variées de congélation.

2. TECHNIQUES DE CONGÉLATION

A. La température finale est celle de l'azote liquide

Nous avons représenté sur la planche I, le schéma des différentes techniques utilisées.

a) *Congélation lente.* Les tissus sont portés par une lamelle de verre placée au centre d'un tube de pyrex, lui-même contenu dans un deuxième tube de pyrex dont il est séparé par un espace annulaire rempli d'air. Le tout est plongé dans l'azote liquide. En faisant varier l'épaisseur des parois, la largeur de l'espace annulaire et le diamètre des tubes, on peut réaliser toutes les vitesses de refroidissement. Le temps mis pour atteindre l'équilibre peut alors varier de 2 à 10 minutes.

b) *Congélation rapide* (figure 6). Les tissus sont également portés par une lamelle de verre placée au centre d'un tube de pyrex de 15 mm de diamètre, 150 mm de long et 1 mm d'épaisseur. En immergeant directement ce tube dans l'azote liquide, on réalise un refroidissement progressif dont la durée est de l'ordre de 1 minute (figure 26). Une méthode semblable a été décrite par Taylor [204]. Pour éviter

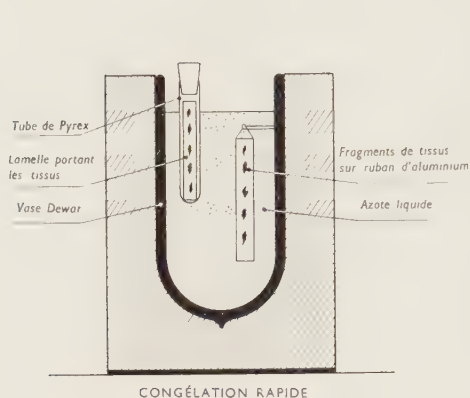


Figure 6. Technique de congélation dans l'azote liquide (-196°C).

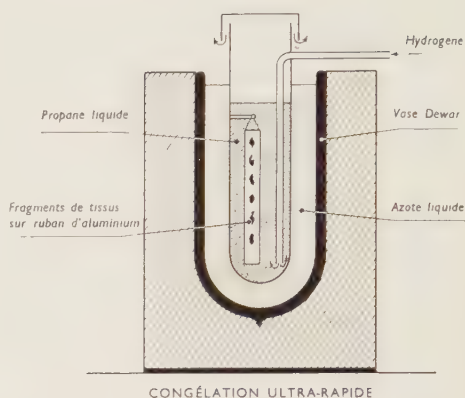


Figure 7. Technique de congélation ultra-rapide dans le propane liquide à -196°C .

que les tissus soient soumis à une dépression prononcée par suite de la condensation de l'atmosphère interne du tube, celui-ci est fermé par un bouchon de liège poreux qui n'assure pas l'étanchéité.

c) *Congélation très rapide* (figure 1). Les tissus sont placés sur un ruban d'aluminium très mince où ils adhèrent par simple capillarité. En plongeant le ruban directement dans l'azote liquide, le refroidissement est très rapide malgré la caléfaction, et sa durée n'excède pas quelques secondes. L'aluminium constitue en effet, un support très bon conducteur de la chaleur et son inertie thermique est négligeable. Dans certains cas, et pour des fragments de tissus très étendus bien que présentant une faible épaisseur, comme la peau, nous avons fixé le tissu sur un cadre métallique. Cette technique a été utilisée pour un matériel semblable par Keeley, Gomez et Brown [79].

d) *Congélation ultra-rapide*. Si l'on désire réaliser des vitesses de refroidissement très élevées, l'azote liquide ne peut plus convenir pour les raisons que nous avons développées plus haut. L'emploi de gaz liquéfiés donnant des températures beaucoup plus basses comme l'hydrogène liquide (-252°C) et l'hélium liquide (-272°C), n'offre aucun avantage par suite, d'une part de leur très faible chaleur spécifique, et de leur manque de maniabilité d'autre part. Le propane liquide, refroidi à -196°C , nous a donné les meilleurs résultats : la figure 2 montre quelle est la technique utilisée. L'immersion brutale du ruban d'aluminium dans le bain liquide assure un refroidissement instantané dont la durée est inférieure à la seconde. Lorsque le refroidissement est achevé, on peut transférer alors le ruban portant les tissus dans l'azote liquide et le conserver indéfiniment.

B. La température finale est comprise entre -196°C et 0°C

Pour refroidir les tissus à des températures comprises entre 0°C et -196°C , nous avons utilisé les mélanges de glace-carbonique et d'alcool jusqu'à -80°C , l'enceinte thermostatique fonctionnant par évaporation d'azote liquide, ou bien encore des bains de propane liquide portés à une température donnée inférieure à -45°C .

Si la congélation s'effectue en tube, il n'y a pas de précautions particulières à prendre. Par contre, il n'est pas possible de réaliser des congélations très rapides ou ultra-rapides à l'aide de bains alcool-glace carbonique. En effet, l'alcool provoquerait une dénaturation immédiate du tissu. Pour réaliser alors des refroidissements instantanés aux températures comprises entre 0°C et -160°C , nous avons utilisé la méthode suivante : les tissus déposés sur une lamelle de verre ou un disque d'aluminium, sont posés à la surface d'un bloc métallique volumineux préalablement refroidi à une température déterminée à l'intérieur de l'enceinte thermostatique (figure 7). Il est possible, en faisant varier l'épaisseur de la lamelle ou du disque de modifier la vitesse de refroidissement qui est toujours très élevée. Entre -160°C et -196°C on réalise les congélations ultra-rapides par immersion directe dans un bain de propane liquide.

3. MAINTIEN DU TISSU CONGELÉ A BASSE TEMPÉRATURE, ENTRETIEN DU FROID

Si le dégel ne doit pas suivre immédiatement la congélation et que les tissus doivent être maintenus à une température déterminée pendant longtemps, il est nécessaire de réaliser des enceintes stables.

La température de -196°C s'obtient facilement en utilisant un vase Dewar rempli d'azote liquide et dont l'ouverture est soigneusement calorifugée. Un remplissage quotidien permet de maintenir constant le niveau d'azote liquide pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois.

Il est également facile d'obtenir la température de $-78,5^{\circ}\text{C}$ par un dispositif analogue où la neige carbonique remplace l'azote liquide. Un remplissage hebdomadaire est alors suffisant.

Pour toutes les températures intermédiaires inférieures à -20°C , nous avons utilisé l'enceinte thermostatique à ébullition d'azote liquide. Le fonctionnement est alors limité à une dizaine d'heures dans la plupart des cas. Toutefois, en assurant un remplissage régulier d'azote liquide, l'appareil peut marcher de façon continue.

Entre $+20^{\circ}\text{C}$ et -20°C , un réfrigérateur à compresseur de type commercial donne entière satisfaction.

4. TECHNIQUES DE DÉGEL

Les méthodes utilisées pour assurer le réchauffement et le dégel sont beaucoup plus simples. Elles utilisent principalement des bains liquides portés à une température donnée supérieure à 0° C. Divers auteurs ont fait usage de températures aussi élevées que 100° C dans le but d'accélérer le réchauffement. Pour éviter tout risque d'altérations nous n'avons jamais dépassé la température de 37° C.

A. Dégel très lent et lent

Le spécimen, contenu dans un tube en pyrex à simple ou double enveloppe, est simplement laissé à l'air où il se réchauffe progressivement. Si l'on désire retarder la vitesse de réchauffement, on place le tube dans une enceinte froide dont on élève lentement la température. Si, au contraire, on désire accélérer le réchauffement, on choisit un tube étroit à paroi mince et on le réchauffe par un courant d'air tiède. Tous les intermédiaires sont réalisables et il est possible de réchauffer le tissu en des temps qui varient de 1 minute à plusieurs heures ou plusieurs jours.

B. Dégel rapide

Il est assuré en immergeant le tube contenant le spécimen dans un bain d'eau ou d'alcool, soit à 37° C, soit à la température ambiante. Le dégel est progressif et sa durée varie de quelques dizaines de secondes à quelques minutes.

C. Dégel très rapide

On obtient la vitesse maxima de dégel en plongeant directement la lamelle ou le ruban d'aluminium portant le tissu, dans une solution physiologique maintenue à + 37° C. Une méthode similaire a été employée par Taylor [204].

Il existe des procédés permettant un réchauffement plus rapide mais ils sont délicats à utiliser et la température finale est mal définie (diathermie).

Nous avons, dans ce chapitre, décrit successivement nos techniques de congélation, de conservation à basse température et de dégel des tissus et organes. Leur application est relativement aisée dans l'ensemble, bien qu'elle nécessite une attention constante. Il convient de signaler en effet qu'elles se trouvent compliquées par le fait qu'elles doivent, dans toute la mesure du possible, être conduites stérilement. En effet, les exigences de l'expérimentation biologique imposent, comme nous allons le voir, une asepsie rigoureuse souvent difficile à réaliser. Nous allons examiner dans le chapitre suivant comment il a été possible de l'obtenir.

Etude expérimentale de l'action des basses températures sur le tissu cardiaque de l'embryon de poulet

Dans une première série de travaux de physiologie expérimentale, nous avons voulu étudier les réactions de la matière vivante à l'exposition aux basses températures. Nous avons choisi pour cela un tissu relativement simple, de maniement commode, qui permette d'effectuer un grand nombre d'expériences de manière reproductible : le tissu cardiaque de l'embryon de poulet, dont l'activité cellulaire a été appréciée par la méthode de culture de tissus *in vitro*.

Le but de nos recherches était de connaître les diverses altérations produites par le froid et de déterminer les conditions optima de refroidissement et de dégel permettant la survie des tissus congelés et leur retour à une activité physiologique normale.

Nous envisagerons successivement, d'une part les techniques utilisées, d'autre part le comportement *in vitro* du tissu cardiaque normal et du tissu, cardiaque soumis à l'action des basses températures.

I. Techniques de culture

Il y a déjà plus d'un demi-siècle que les travaux fondamentaux de Harrison, Alexis Carrel et Albert Fischer ont démontré qu'il était possible de faire proliférer des fragments tissulaires hors de l'organisme. Depuis lors, des centaines de chercheurs ont étudié avec précision les diverses conditions du développement cellulaire *in vitro*. Malgré l'existence de différences importantes entre les nombreuses méthodes qui ont été proposées, il est possible de retrouver dans toutes les techniques des exigences identiques. Le tissu prélevé doit être de faible taille, et doit baigner dans un milieu aseptique contenant des facteurs de croissance et des éléments nutritifs. Il doit être abondamment oxygéné et les produits de déchets du métabolisme doivent être éliminés régulièrement soit par renou-

vement du milieu nutritif, soit par repiquage du tissu sur un milieu neuf. La culture sur lames selon la méthode d'Albert Fischer [43] respecte ces divers impératifs et c'est celle que nous avons utilisée.

1. TYPES DE CULTURES

Le tissu cardiaque, découpé en fragments de 1 mm environ, est implanté soit sur une lamelle simple, soit sur une double lamelle de Maximow, dans une goutte (1/10 cm³) de milieu nutritif. Le milieu varie selon le type de culture.

A. Culture sur lamelle simple

Le tissu est implanté dans un milieu entièrement solide qui contient :

Plasma de poulet	2	} 1 goutte / lame
Liquide physiologique d'Earle	1	
Extrait embryonnaire EE 50	1	

Les cultures sont incubées à 38° C et repiquées tous les trois jours sur un milieu neuf.

B. Culture sur double lamelle

Le tissu est implanté dans un milieu solide sur lequel on dépose après coagulation, deux gouttes de solution nutritive :

Milieu solide

Plasma de poulet	1
Solution nutritive	1

Solution nutritive

Sérum placentaire ou sérum de cheval chauffé	3
Extrait embryonnaire de poulet EE 25	3
Liquide physiologique d'Earle	4

Les cultures incubées à 38° C sont lavées et réalimentées tous les trois jours. Les repiquages ont lieu toutes les deux semaines.

2. PRÉPARATION DES MILIEUX ET DU MATÉRIEL

4. Plasma de poulet

Le sang d'un coq adulte d'un an, est recueilli par saignée carotidienne directe dans des tubes de pyrex maintenus à 0° C. Ces tubes sont centrifugés à froid pendant 5 mn à 3.000 tours mn, le plasma surnageant est transvasé stérilement dans des tubes paraffinés et conservés au réfrigérateur à - 2° C. On n'utilise ni anesthésique, ni antibiotique, ni anticoagulant.

B. Sérum placentaire

Le sang de placentas humains est recueilli par ponction des veines placentaires, tout de suite après la parturition. Après coagulation et rétraction du caillot, le sérum est décanté, réparti stérilement et conservé à $+ 2^{\circ}\text{C}$. Il ne contient ni antibiotique, ni anesthésique, ni protecteur chimique.

C. Sérum de cheval

Le sang recueilli par saignée à la veine jugulaire, est laissé à coaguler pendant 24 heures. On prélève le sérum surnageant qui est conservé à $+ 2^{\circ}\text{C}$. Il ne contient ni antibiotique, ni anesthésique, ni protecteur chimique.

Le sérum de certains chevaux s'est parfois montré légèrement toxique. Il est possible d'éliminer cet inconvénient en le chauffant à 56°C pendant 30 minutes, puis en le centrifugeant 5 minutes à 3.000 tours.

D. Solution physiologique d'Earle

C'est un liquide répondant à la formule suivante :

	g/l
Chlorure de sodium (NaCl).....	6,80
Chlorure de potassium (KCl).....	0,40
Chlorure de calcium (CaCl ₂).....	0,20
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ , 7H ₂ O).....	0,20
Phosphate monosodique (NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O).....	0,14
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃).....	2,20
Glucose.....	1,00
Eau bidistillée.....q. s. p.	1.000 cm ³

La solution est stérilisée par filtration sur Seitz EKS II, et conservée à $+ 2^{\circ}\text{C}$.

Dans certains cas elle contient comme indicateur de pH, 0,01 % de rouge phénol (Liquide d'Earle rouge).

E. Extrait embryonnaire

Des embryons de poulet de 9 jours sont ouverts par la face ventrale, puis découpés aux ciseaux en assez gros fragments après ablation du cœur et de la vésicule biliaire (H. B. Fell [41]). Trois lavages au liquide d'Earle éliminent toute trace de sang. Les morceaux essorés sont placés dans la presse à embryons d'Albert Fischer, et à la pulpe résultante on ajoute un volume égal de solution d'Earle. On laisse l'extraction se faire à la température ordinaire pendant une heure, puis on centrifuge 10 minutes à 2.500 tours. Le liquide surnageant, appelé selon le code international EE 50, est conservé à $- 25^{\circ}\text{C}$ à l'état congelé (Technique de G. O. Gey [53]). Avant utilisation, on le dégèle et on lui fait subir une deuxième centrifugation. Cet extrait ne contient pas d'antibiotique ni de protecteur chimique.



Figure 8. Vue générale de la table opératoire dans la salle stérile.



Figure 9. Préparation des explants.



Figure 10. Homogénéisation du milieu de culture.



Figure 11. Montage sur lames à microscopie.

F. Matériel

Les précautions usuelles de la culture de tissus sont prises pour le lavage, la préparation et la stérilisation du matériel nécessaire.

3. MODE OPÉRATOIRE

Les figure 8, 9, 10 et 11 donnent un aperçu des principales phases. Les opérations ont lieu dans une salle stérile et toutes les manipulations sont effectuées aseptiquement.

4. MÉTHODES D'EXAMEN ET DE MESURE

Les cultures sont observées périodiquement soit à la température ordinaire, soit dans une étuve à microscope maintenue à 38° C. Un filtre anticalorique empêche l'échauffement de la préparation. Les examens sont pratiqués en fond clair, en fond noir et en contraste de phase. La surface des cultures a généralement servi pour apprécier l'étendue de la croissance. Medawar [110], Pomerat [158] et Murray [123,124] ont en effet montré que ce test était statistiquement satisfaisant dans le cas d'expériences à court terme portant sur des explants primaires, ce qui est le cas de la plupart des expériences que nous avons réalisées. La mesure de la surface se fait par projection de la culture et évaluation de l'aire de croissance. Dans certains cas nous avons utilisé le poids de la culture selon la méthode de R. Meyer [119], ainsi que la mesure de son activité respiratoire à l'aide d'un micromanomètre.

Des préparations de contrôle fixées et colorées ont également été réalisées. Les fixateurs employés ont été : le formol à 10 % en solution physiologique, le liquide de Zenker ou les vapeurs osmiques. Les colorations : Feulgen vert de méthyle, hématoxyline, violet de Crésyle.

Les préparations, avant fixation, sont en général lavées par immersion pendant 15 minutes dans trois bains de liquide physiologique à + 38° C, ainsi que le recommande M. R. Murray. Toutefois, pour l'étude des figures mitotiques et selon la technique en usage aux Strangeways Research Laboratories [76], la fixation a lieu dès la sortie de l'étuve, avant même tout examen microscopique.

II. Croissance *in vitro* du tissu cardiaque normal

I. PRÉLÈVEMENT DU TISSU CARDIAQUE

De nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle très important joué par l'âge des embryons de poulet dans le développement ultérieur de leurs tissus *in vitro*. Suzuki [199], Cohn et Murray [32] ont montré que la durée de la période latente

précédant la migration des premières cellules augmentait avec le nombre de jours d'incubation. Ce fait fut confirmé par Oda et Kamon [126], Olivo et Slavich [135], puis généralisé par Hoffman, Goldschmidt et Doljanski [55, 70]. La forme même de la croissance, du moins à ses débuts, dépend de l'âge de l'embryon. Les travaux de Medawar [111] ont en effet démontré d'une part que l'amplitude du développement *in vitro*, au cours des premiers jours de mise en culture, dépendait de la durée de la période latente s'écoulant avant la migration, et que, d'autre part, l'énergie de croissance, telle qu'il la définit, diminuait de façon exponentielle avec l'âge.

Ces divers phénomènes ont été bien étudiés et ils donnent lieu à des divergences marquées dans le comportement cellulaire du tissu lors de ses premières heures de vie hors de l'organisme. Il convient toutefois de ne pas en exagérer la portée car les différences s'estompent assez rapidement et deviennent déjà difficiles à percevoir au bout d'une à deux semaines.

Cependant, comme dans nos recherches nous avons principalement réalisé des cultures à court terme, nous avons toujours porté la plus grande attention à l'âge des embryons. Ce dernier a varié de 7 jours à 12 jours, mais nous avons de préférence utilisé des embryons de 10 jours et dans tous les cas, au cours d'une même série d'essais, tous les embryons étaient du même âge.

4. Technique de prélèvement

Le cœur entier est prélevé aseptiquement, puis débarrassé de toutes traces de sang par immersion dans plusieurs bains de liquide d'Earle. Il est alors découpé au couteau à membranule, en fragments de 1 2 à 1 mm de côté (figure 9), puis mis en culture (figure 10). La paroi ventriculaire est seule utilisée par suite de la mauvaise croissance du tissu des oreillettes et du sinus. La cloison interventriculaire est également abandonnée.

Les fragments de tissus que l'on recueille ainsi sont cultivés soit directement, soit après exposition aux basses températures. La mise en culture a lieu alors après le dégel et le traitement final. L'incubation se fait vers 38° C et on procède pendant 3 ou 4 jours à des contrôles et examens réguliers.

2. DÉVELOPPEMENT DU TISSU CARDIAQUE NORMAL : LES FIBROBLASTES DU CŒUR

A. Evolution de la croissance

La migration cellulaire à partir de l'explant s'observe très rapidement et au bout de 48 heures, la culture présente une forme caractéristique. Son contour est circulaire et, dans la zone de migration, les cellules sont disposées en files radiaires. Elles constituent un réticulum très dense et ne sont séparées que dans la zone la plus périphérique. Dans toutes les autres régions, elles sont réunies par des

ponts protoplasmiques étroits en un réseau déformable mais serré. Entre les cellules individuelles et les travées cytoplasmiques, on trouve des espaces plus ou moins grands selon la densité de la population cellulaire.

Lorsque la culture est un peu plus ancienne (72 heures), il apparaît autour de l'explant, une zone plus épaisse où s'ébauche une structure concentrique d'aspect plus organisé. Au phénomène de migration, se superpose également la multiplication cellulaire.

A l'intérieur de l'explant, l'index mitotique, relativement élevé au début, s'abaisse progressivement pendant les premiers jours de culture, puis augmente à nouveau de façon très importante au bout du troisième ou quatrième repiquage. (Olivo et Slavich [136]). Dans la zone de croissance au contraire, les mitoses sont nombreuses et l'index mitotique atteint dès le début des valeurs très élevées (Olivo [135, 136]). La presque totalité se produit à la périphérie. Dans la partie centrale de la zone de croissance, on trouve également des mitoses mais elles sont beaucoup moins nombreuses ou, du moins, beaucoup plus lentes (Fischer et Parker, 1929 [44]).

Au bout de trois jours la croissance se ralentit et la plupart des cellules périphériques sont très riches en vacuoles. Il est nécessaire alors, soit de procéder à un repiquage (simple lamelle), soit de laver et réalimenter la culture (double lamelle de Maximow).

B. Etude cytologique

Comment se présente la population cellulaire qui se développe à partir d'un explant de cœur de poulet ? Initialement, le tissu cardiaque d'un embryon de 7 à 10 jours contient des cellules musculaires, de l'endothélium et du tissu mésenchymateux. Malgré cette hétérogénéité de départ assez importante, l'évolution de la culture est relativement simple. Au début, on voit émigrer quelques éléments sanguins, quelques cellules endothéliales, mais surtout une population dense de cellules allongées, très souvent fusiformes, pourvues d'un noyau ovale contenant deux gros nucléoles irréguliers et peu de chromatine apparente. Elles ne sont pas phagocytaires, contiennent des gouttelettes graisseuses et un chondriome abondant qui tend à donner surtout des chondriocentes. L'ensemble forme un réseau dense, infiltrant, qui de préférence s'enfonce dans le coagulum. Au bout de quelque temps il ne subsiste plus qu'un seul type de cellules. Leur aspect diffère selon les régions de la culture. Dans la partie centrale elles sont larges, aplaties, d'une taille irrégulière et variable, en général non orientées et elles sont anastomosées entre elles.

Dans les régions périphériques, elles sont plus allongées et parfois libres (Levi, 1924, [89]). Dans la partie moyenne, leur longueur varie de 100 à 140 μ et le diamètre du noyau est voisin de 20 μ . La coloration vitale au rouge neutre

et au vert janus, montre que les vacuoles contiennent fréquemment un petit granule. Comme les gouttelettes lipidiques, elles sont placées aux pôles du noyau. Très souvent, les vacuoles et les mitochondries sont rassemblées dans une aire juxta nucléaire, autour du centriole. Il s'agit là d'une zone de métabolisme très intense où arrivent la plupart des gouttelettes formées contre la membrane cellulaire par pinocytose (Gey [52]). Ces diverses formes cellulaires constituent une population très homogène à laquelle on a donné, depuis fort longtemps, le nom de fibroblastes du cœur.

Que représentent ces fibroblastes, de quelle lignée sont-ils originaires ? C'est un problème fort complexe et pendant de nombreuses années les avis ont été divergents. Beaucoup d'auteurs considèrent que le terme de fibroblastes s'applique à toute cellule mésenchymateuse en culture, quelle que soit son origine (Medawar [111]). En réalité, comme le fait si justement remarquer Albert Fischer [42], « il s'agit là d'un terme de laboratoire introduit avec la technique *in vitro*, et qui s'applique, en culture, à tous les éléments cellulaires qui ressemblent aux éléments conjonctifs, qui ont une forme plus ou moins fuselée et une structure réticulaire. Les confusions que ce nom a pu introduire tiennent principalement à ce que toute cellule mésenchymateuse présente, en culture, une forme très voisine de celle des fibroblastes du tissu conjonctif réticulé de l'organisme. Cette catégorie englobe donc à la fois les myoblastes, les fibroblastes d'origine osseuse ou cartilagineuse, et les cellules endothéliales et mésothéliales. Le terme collectif de fibroblastes n'est alors qu'une dénomination naturelle qui exprime l'homogénéisation de ces divers types de cellules mésenchymateuses en culture de tissus ».

Pour Alexis Carrel [29], les fibroblastes du cœur sont issus du tissu de soutien myocardique, tandis que les myoblastes et les éléments endothéliaux dégénèrent. C'est également l'opinion de Congdon [33]. Cependant, G. Levi [89] et O. Olivo [127 à 140] démontrent que les fibroblastes ne sont pas d'origine mésenchymateuse, mais proviennent de la différenciation des myoblastes. L'addition d'extrait embryonnaire au milieu de culture serait responsable, en grande partie, selon Olivo (1926) [128] de ce processus par lequel les éléments musculaires perdraient rapidement leurs caractères histologiques propres et leurs propriétés physiologiques. Olivo, (1930) [133], reconnaît toutefois que dans certaines conditions, ces myoblastes différenciés peuvent produire du collagène comme les éléments conjonctifs du tissu sous-cutané. Ce qui est certain, c'est que les « fibroblastes du cœur » se sont toujours comportés comme une souche cellulaire caractéristique et homogène, qu'elle provienne d'une culture très ancienne ou très récente. Il est donc raisonnable de penser avec A. Fischer [42], qu'il s'agit toujours du même type de cellule qui s'isole de l'explant cardiaque et que cette lignée cellulaire présente des caractères physiologiques fondamentaux qui

la distinguent sans ambiguïté possible, de tous les types cellulaires, identiques au point de vue morphologique, comme les fibroblastes du tissu conjonctif interstitiel des muscles, du tissu sous-cutané, du périoste ou du périchondre.

Quelle est alors la lignée cellulaire originelle d'où provient la souche de fibroblastes ? D'après G. Levi, les diverses possibilités sont les suivantes : les cellules musculaires périssent et la croissance des fibroblastes interstitiels devient prédominante ; la culture est un mélange intime de fibroblastes et de cellules endothéliales ; les fibroblastes du cœur ont pour origine des myoblastes qui se sont différenciés.

Cette dernière hypothèse paraissait la plus plausible. En effet, de très nombreux travaux (Burrows [27], Congdon [33], Garofolini [50], Hibuse [67, 68], Mogue [71], Levaditi [88], Lewis [91], Mayehara [109], Olivo [127 à 134], De Renyi [165], Stilwell [198,199]), ont montré que les explants de cœur et que les cellules qui en étaient issues, présentaient dans les premières phases de la culture, des phénomènes de contraction spontanée. Ces recherches semblaient indiquer une origine musculaire aux fibroblastes. L'école italienne s'est particulièrement intéressée à ce problème.

Les études très poussées de Levi et Olivo leur ont permis de démontrer que les fibrilles musculaires disparaissaient très rapidement en présence d'extrait embryonnaire. Au bout de 48 heures, il n'y a déjà pratiquement plus de fibrilles striées dans l'explant et en 96 heures, elles ont disparu. Si la prolifération est active, les pulsations spontanées que présentent les cultures disparaissent. Elles persistent au contraire pendant plusieurs mois, si la croissance est arrêtée par suppression de l'extrait embryonnaire. Que cette contraction soit due à la présence effective de fibrilles (Levi [89]), ou qu'elle provienne d'une structure purement cytoplasmique comme le pense Lewis [93], il est certain qu'elle est la marque d'une origine myoblastique.

Il semble donc logique d'admettre que les « fibroblastes du cœur » de l'embryon de poulet cultivés *in vitro*, proviennent de myoblastes différenciés.

III. Histophysiologie du tissu cardiaque soumis à l'action des basses températures

A la suite des études précédentes qui nous ont permis de connaître l'histophysiologie normale du tissu cardiaque *in vitro*, nous avons recherché quels étaient les effets de l'exposition préalable du tissu aux basses températures, sur son évolution ultérieure en culture.

1. MÉTHODES DE TRAVAIL

Le cœur de l'embryon, prélevé aseptiquement, est découpé en fragments de 1 mm de côté environ. Après lavage pendant 30 minutes dans du liquide d'Earle, les fragments, soigneusement essorés, sont congelés et dégelés selon les techniques décrites précédemment. Le tableau suivant indique les vitesses de refroidissement et de dégel.

<i>Préparation</i>	<i>Technique</i>	<i>Durée en secondes</i>
Thermocouple seul	Congélation ultra-rapide dans le propane liquide	0,04
Thermocouple + ruban d'aluminium	Congélation ultra-rapide dans le propane liquide	0,10
	Congélation ultra-rapide dans le propane liquide	0,16
Thermocouple + ruban d'aluminium portant un fragment de tissu de 1 mm ³	Congélation très rapide dans l'azote liquide	0,40
	Congélation rapide en tube dans le propane liquide	45-55
	Congélation rapide en tube dans l'azote liquide	55-65
	Dégel très rapide dans le liquide d'Earle à + 20° C	0,40

Après exposition aux basses températures, les explants sont lavés de nouveau dans le liquide d'Earle contenant 1.000.000 d'unités de pénicilline et 1g de streptomycine par litre, pendant 3 minutes, puis dans du liquide d'Earle normal pendant 12 minutes. Les risques d'infection apportés par le contact direct de l'azote liquide, sont ainsi écartés.

Pour chaque série expérimentale, des préparations témoins sont réalisées à la fois à partir de fragments du même cœur, et de fragments de cœurs d'embryons de même âge. Plusieurs milliers de cultures ont été ainsi réalisées.

2. ÉVOLUTION « IN VITRO » DES TISSUS CONGELÉS

A. Congélation à — 196° C sans traitement préalable

Lorsque le tissu cardiaque est refroidi sans traitement préalable jusqu'à la température de — 196° C, on n'observe aucune survie, quelles que soient les techniques de congélation et de dégel utilisées. L'exposition à des températures plus élevées et jusque vers — 30° C, donne des résultats identiques. Les explants deviennent noirâtres et ne donnent aucune croissance en culture (figure 12-0).

Les coupes histologiques montrent que le tissu est entièrement mort : toutes les cellules ont des noyaux picnotiques (figure 30).

Dans quelques cas très rares, toutefois, il a été possible d'apercevoir deux ou trois cellules migratives. Ces cellules d'aspect caractéristique, fusiformes, apparaissent en général au bout de 24 heures d'incubation. Elles restent très proches de l'explant : leur cytoplasme se charge bientôt en globules lipidiques et elles dégénèrent très rapidement.

De nombreux auteurs ont obtenu des résultats semblables, soit sur le cœur de l'embryon de poulet (Luyet [105, 106]), soit sur d'autres tissus (Smith [191 à 195]).

Par contre, pour des températures supérieures à -30°C , on a trouvé souvent un degré de survie appréciable (Bucciante [20 à 25], Klinke [87, 83]). Les pourcentages de cellules survivantes sont d'ailleurs très variables. L'explication que l'on peut en donner semble être la suivante : dans beaucoup de cas le tissu a dû rester à l'état de surfusion et le refroidissement n'a pas été accompagné de cristallisation. La survie est alors très élevée. Au contraire, lorsque le tissu s'est solidifié, seules quelques cellules restent vivantes.

B. Congélation à -196°C après traitement préalable par la glycérine

Tous les chercheurs qui se sont intéressés aux actions biologiques des basses températures, ont essayé de trouver des traitements particuliers qui permettent aux tissus de supporter les effets nocifs du froid.

Les remarquables travaux de Becquerel [7] ont montré que des tissus végétaux ou des organismes animaux primitifs, comme les rotifères et les tardigrades, pouvaient être refroidis sans danger à des températures aussi basses que $0,0075^{\circ}\text{K}$, s'ils avaient été préalablement déshydratés. De nombreux auteurs ont cherché à appliquer ce procédé aux tissus animaux. Cela s'est avéré très délicat car les cellules animales, d'une manière générale, ne tolèrent pas un retrait important de leur eau de constitution. Toutefois, des déshydratations ménagées ont pu être obtenues avec l'éthylène-glycol. C'est cette méthode qui a permis en particulier à Luyet et à ses collaborateurs [106], de conserver la viabilité d'un certain nombre de tissus embryonnaires après un séjour prolongé dans l'azote liquide. La déshydratation, cependant, n'est pas applicable à la majorité des cas. Il est en effet difficile à la fois de contrôler le départ d'eau et également de déterminer avec précision le degré de dessiccation que peuvent tolérer les tissus animaux. De toute manière, et à la différence du règne végétal, il ne semble pas qu'une déshydratation totale soit compatible avec le maintien de la vie.

Aussi, c'est plutôt vers la recherche de substances protectrices que se sont orientés la plupart des chercheurs. Ces substances devaient présenter le caractère commun de n'être pas ou peu toxiques, de pouvoir se mêler aisément aux liquides

péricellulaires et intracellulaires et de n'être pas altérées par les processus de congélation et de dégel.

Certains sucres ont donné de bons résultats. Le glucose, le saccharose et le lactose ont semblé apporter une protection efficace contre les effets nocifs du froid. Les travaux de Greaves [58] et de Fry [49] ont montré leur intérêt en bactériologie.

Toutefois, dans l'ensemble, pour les tissus animaux, les résultats ne furent pas encourageants jusqu'à la découverte des propriétés remarquables de la glycérine. C'est au biologiste français Jean Rostand [145] que l'on doit, en 1946, les premières observations sur le pouvoir protecteur du glycérol. Ces expériences capitales n'eurent cependant pas l'écho qu'elles méritaient et il fallut attendre 1949, pour que, de manière assez paradoxale, une équipe anglaise, Polge, Smith et Parkes [155], découvre de nouveau les propriétés protectrices du glycérol. C'est d'ailleurs la même équipe, qui, depuis lors, sous la direction du professeur Parkes, a fait progresser de manière étonnante les connaissances scientifiques dans le domaine des applications biologiques des basses températures. Il était dès lors naturel que nous utilisions le glycérol pour protéger nos tissus au cours de la congélation, et le but principal de l'ensemble de notre travail, a été d'étudier ces conditions de protection, et d'en chercher l'explication.

a) Technique. Les cœurs, après prélèvement, sont découpés et les fragments imprégnés dans du liquide d'Earle contenant du glycérol. La préparation de cette solution s'effectue stérilement à partir de liquide d'Earle stérilisé par filtration, et de glycérine R. P. (bidistillée pour analyses), chauffée au four à 175° pendant 35 minutes. Les solutions ont été réalisées de deux manières différentes : par mélange direct de glycérol et de liquide d'Earle normal : par mélange de glycérol et d'une solution saline d'Earle concentrée, de telle manière que la teneur en sels dissous du mélange soit identique à celle du liquide d'Earle pur. Les résultats donnés par les deux méthodes ont été strictement identiques : aussi, avons-nous utilisé de préférence, les solutions préparées de la première manière.

Après congélation, le dégel est effectué soit dans le liquide initial, soit dans du liquide d'Earle pur à $+ 20^{\circ}$ C. Les morceaux de tissus sont alors essorés soigneusement et mis en culture. La croissance est appréciée par comparaison avec des cultures témoins imprégnées de la même manière, mais non congelées.

b) Résultats expérimentaux. Nous avons étudié les modifications de l'activité physiologique du tissu en fonction de la teneur en glycérol du liquide d'imprégnation d'une part, et en fonction des vitesses de congélation et de dégel ainsi que de la température de conservation d'autre part.

Évaluation du rôle protecteur du glycérol. Dans une première série d'expériences nous avons recherché la concentration en glycérol et la durée d'imprégnation permettant une survie optima. Pour cela, nous avons opéré dans des conditions bien précises de congélation et de dégel : les fragments de cœur ont été congelés sur ruban d'aluminium par immersion directe dans l'azote liquide, conservés 30 minutes à -196°C , puis dégelés par immersion directe soit dans du liquide d'Earle simple, soit dans le liquide d'imprégnation. La teneur en glycérol a varié de 0 à 45 % en poids et la durée d'imprégnation de 0 à 60 minutes.

Durée d'imprégnation et toxicité du glycérol. Pour obtenir des résultats comparables, il est nécessaire d'imprégner les fragments de tissus pendant 10 minutes au moins, l'optimum se situant entre 15 et 30 minutes à la température de $+20^{\circ}\text{C}$. Par contre, un séjour de 60 minutes dans la solution glycérolée de concentration moyenne, ne montre pas d'effets toxiques.

Influence de la concentration en glycérol (figure 12). Le degré de protection apporté par le glycérol augmente avec la concentration et atteint un optimum pour 25 à 30 %. Au-delà, un léger effet toxique commence à se produire ; il semble d'ailleurs être en relation avec les processus de congélation car il n'apparaît pas dans les témoins non congelés. La protection est un phénomène graduel et la courbe de variation en fonction des concentrations est continue et présente un décours régulier (figure 13). A l'optimum, la croissance est normale et au bout de 48 heures, les cultures congelées ne se distinguent pas des témoins. L'examen microscopique permet de se faire une idée plus précise de l'effet protecteur.

Explants traités par des solutions contenant 5 à 10 % de glycérol. La croissance est faible et irrégulière (figure 12, 5 et 10). Il existe un temps de latence assez long (24 à 72 heures) avant l'apparition des premières cellules migratrices. L'explant initial contient de nombreux noyaux picnotiques. Dans l'auréole de croissance les cellules sont étroites, allongées et disposées en cordons. La culture est mince et il n'y a que deux ou trois assises cellulaires dans sa partie centrale (figures 14 et 15). On note pourtant quelques mitoses normales dans la zone externe. En périphérie, les cellules sont souvent chargées de globules lipidiques, leur noyau est irrégulier et le chondriome fragmentaire (figure 16). Elles dégénèrent d'ailleurs rapidement. Les repiquages donnent de mauvais résultats.

Explants traités par des solutions contenant 10 à 20 % de glycérol. La croissance est importante et régulière (figure 12, 10 à 20). Il existe encore un temps de latence de 12 à 24 heures avant migration. L'explant contient quelques noyaux picnotiques. L'auréole de croissance est dense et les cellules y présentent une

disposition normale. Il y a peu de cellules libres en périphérie (figure 17). L'organisation cellulaire autour de l'explant est ébauchée (figure 18). Les repiquages donnent des cultures filles dont la croissance est bonne.

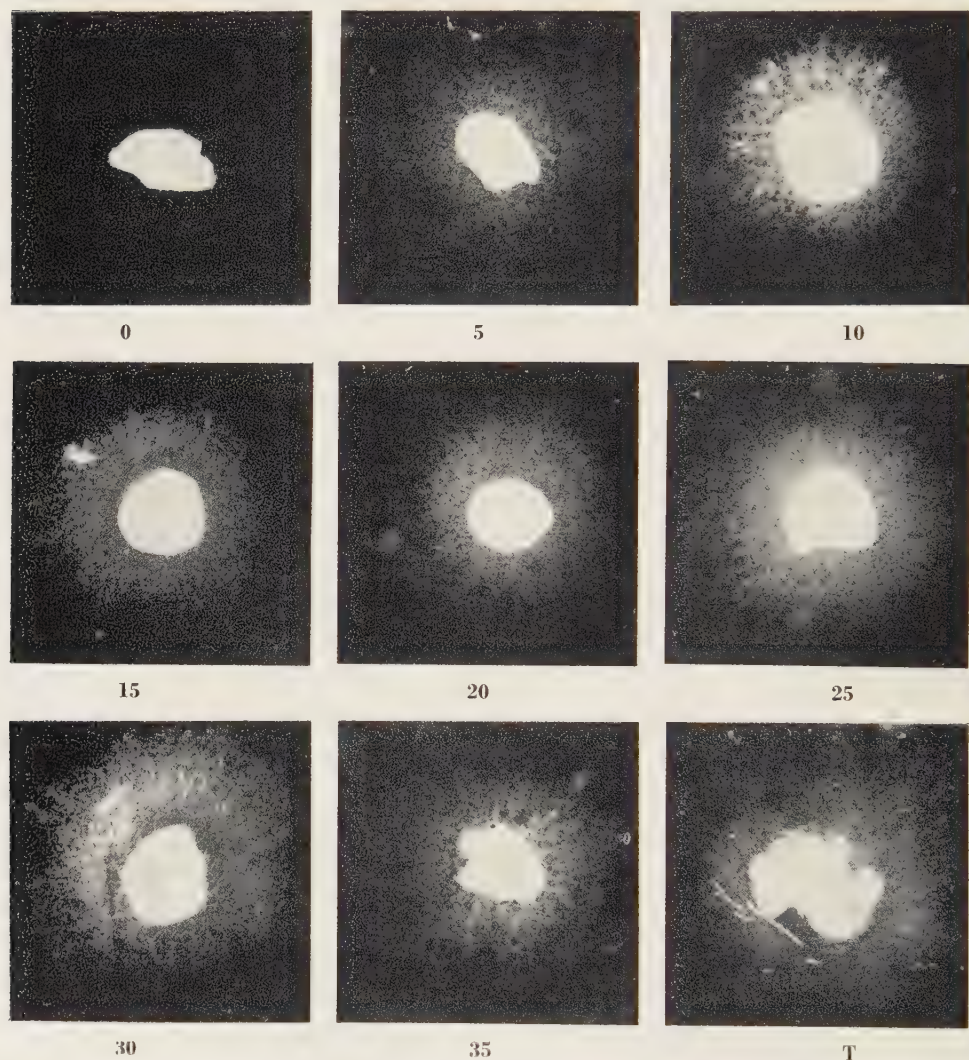


Figure 12. Evaluation du rôle protecteur de la glycérine. Croissance des fibroblastes provenant de fragments du cœur d'embryon de poulet (8 jours), congelés dans l'azote liquide après imprégnation dans du liquide d'Earle contenant 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 % de glycérol. — T : témoin non congelé. Fond noir $\times 10$. Cultures vivantes examinées au bout de 72 heures d'incubation à 38° C.

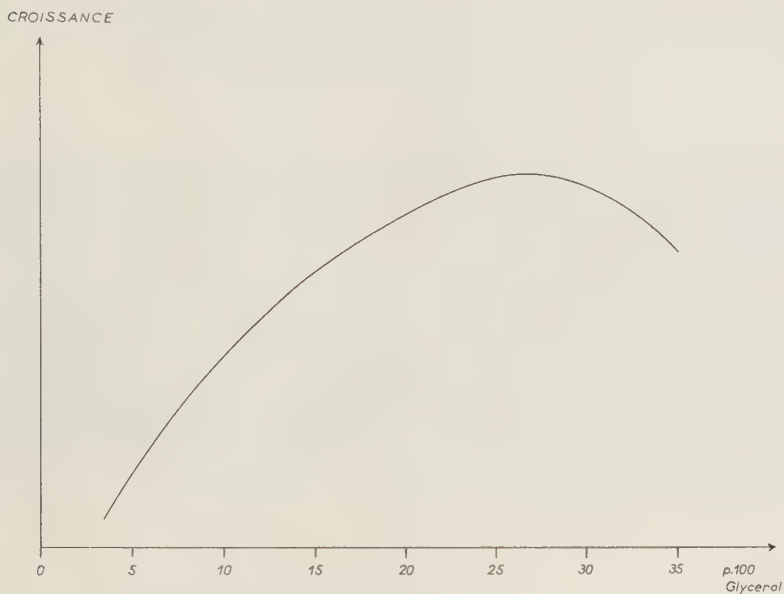


Figure 13. Variation de la croissance *in vitro* de fragments de cœur d'embryon de poulet de 8 jours, congelés dans l'azote liquide, en fonction de la concentration en glycérol du liquide d'imprégnation préalable. (La surface de la culture a été utilisée comme index de croissance.)

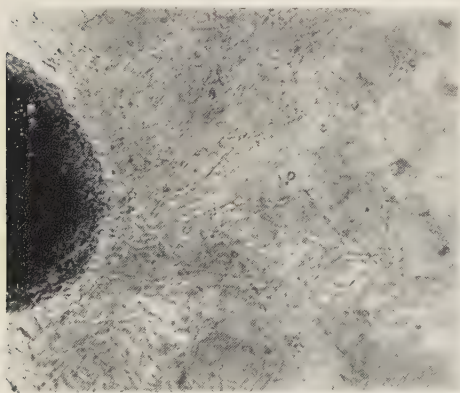


Figure 14. Cœur d'embryon de poulet de 8 jours, congelé dans le propane liquide à -196°C , après imprégnation dans du liquide d'Earle contenant 5 % de glycérol. Culture vivante examinée au bout de 72 heures d'incubation à 38°C ($\times 75$). Noter l'absence de zone organogénique autour de l'explant.

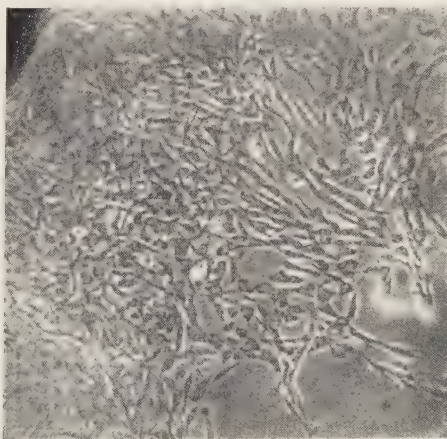


Figure 15. Préparation semblable traitée avant congélation par du liquide d'Earle contenant 10 % de glycérol. Culture vivante examinée au microscope à contraste de phase. (72 h) ($\times 90$).

Préparations cytologiques fixées et colorées de cultures de fragments de cœur d'embryon de poulet de 8 jours, congelés dans l'azote liquide (Zenker — Violet de crésyle) ($\times 450$)

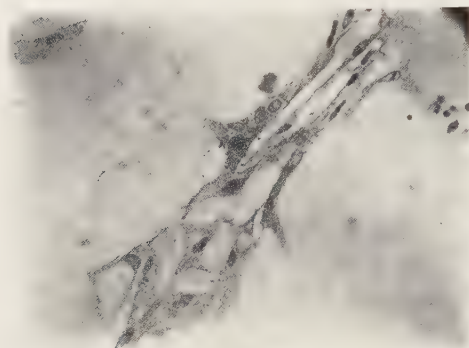


Figure 16. Imprégnation préalable dans du liquide d'Earle contenant 10 % de glycérol (E R G₁₀).

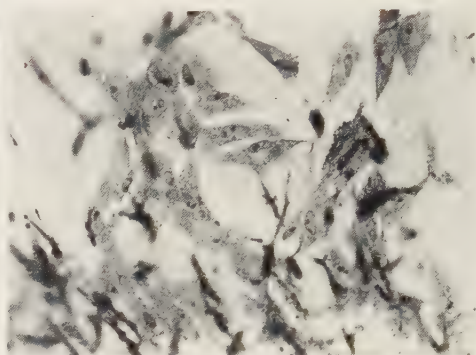


Figure 17. Imprégnation préalable dans du liquide d'Earle contenant 20 % de glycérol (E R G₂₀).

Explants traités par des solutions contenant 20 à 30 % de glycérol. La croissance est excellente (figure 12. 20 à 30). Elle ne se distingue de celle des témoins que par l'existence d'un faible temps de latence au début de la culture. Les cellules de l'explant sont normales (figure 19). L'auréole de croissance est épaisse et l'index mitotique très élevé. De nombreuses cellules sont libres à la périphérie. Il existe une zone d'organisation avec disposition des cellules en assises concen-

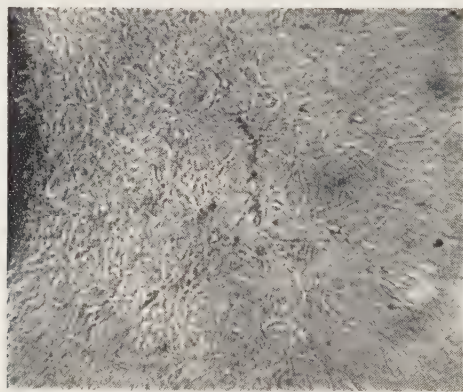


Figure 18. Cœur d'embryon de poulet de 8 jours traité avant congélation par du liquide d'Earle contenant 25 % de glycérol. La culture est épaisse et une zone d'organisation existe à la périphérie de l'explant. (72 h) ($\times 75$).

Préparations cytologiques fixées et colorées de cultures de fragments de cœur d'embryon de poulet de 8 jours, congelés dans l'azote liquide (Zenker — Violet de crésyle) ($\times 450$)

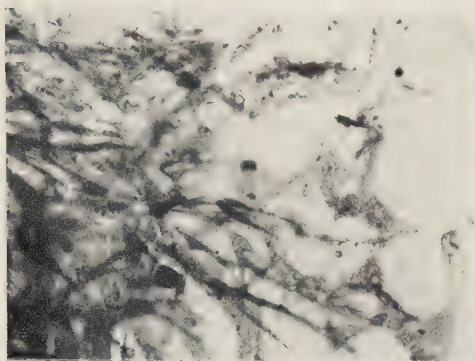


Figure 19. Imprégnation préalable dans du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol (E R G₃₀).

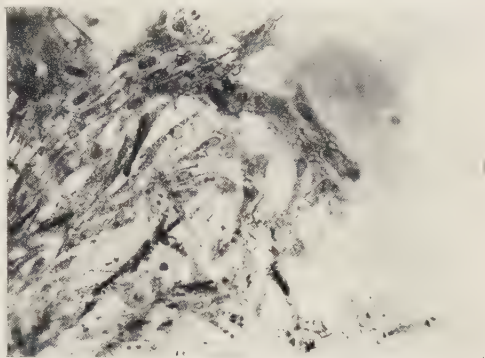


Figure 20. Imprégnation préalable dans du liquide d'Earle contenant 40 % de glycérol (E R G₄₀).

triques d'aspects fibreux autour de l'explant (figure 18). Les repiquages donnent des cultures filles à croissance normale.

Explants traités par des solutions contenant plus de 30 % de glycérol. La croissance est irrégulière (figure 12, 35). Le plus souvent l'auréole de croissance contient des paquets cellulaires d'aspect fibreux. Les mitoses sont malgré tout nombreuses, mais les cellules périphériques se chargent très vite en lipides et dégènèrent (figure 20). Il existe également des cellules libres en périphérie mais elles sont presque toutes vacuolisées.

Dans l'ensemble de ces expériences, nous avons constaté que les résultats les meilleurs et les plus reproductibles étaient obtenus lorsque le dégel était effectué dans le liquide d'imprégnation. Le liquide d'Earle pur donne également de bons résultats mais ils sont moins fidèles. La température du liquide servant au dégel ne nous a pas paru être un facteur critique et nous n'avons pas obtenu d'améliorations sensibles en dégelant à $+ 37^{\circ}\text{C}$ comme il a été indiqué par différents auteurs.

Le glycérol a donc un rôle protecteur certain, et nos résultats concordent avec ceux de Luyet [107]. L'optimum se situe vers 25 % et ce chiffre diffère quelque peu des valeurs données par les auteurs pour d'autres tissus. A. S. Parkes [142] et A. U. Smith [192] indiquent 15 % pour la plupart des tissus endocriniens. C'est également la teneur employée par Earle [147] pour les cornées. Taylor [204] utilise 80 % pour la peau du rat. Gey [53] 20 % pour la souche HeLa. Polge et

Parkes [152] et Smith et Polge [193] 2 % pour les spermatozoïdes de coq et 15 % pour ceux de taureau. Parez [123] et Sherman [204] préfèrent 7,5 % pour le sperme de bovins.

Il semble donc que le pourcentage de glycérol nécessaire pour assurer une protection efficace varie considérablement d'un tissu à l'autre. Des expériences approfondies ont été réalisées dans ce domaine par Scherer et Hoogasian [181] qui ont travaillé d'une part sur la Souche L d'Earle, et d'autre part sur la Souche HeLa de Gey. Ces auteurs ont montré que ni le dextrose ni le sérum pur ne pouvaient apporter de protection équivalente à celle du glycérol. Une concentration de 5 % représentait l'optimum pour la Souche L, tandis que 20 % étaient nécessaires pour la Souche HeLa. Dans ces conditions, après congélation à la température de -60°C à -70°C , il a été possible de conserver la viabilité des cellules pendant une période de six à sept mois. Il est très difficile, d'ailleurs, d'extrapoler ces résultats à d'autres types de tissus. En effet, les conditions de refroidissement de cellules isolées en suspension, d'origine adulte, sont sensiblement différentes de celles que l'on rencontre dans la congélation d'un fragment de tissu massif d'origine embryonnaire.

De toute manière, il apparaît comme certain que l'effet de protection est graduel, et ceci semble indiquer qu'un plus ou moins grand nombre de cellules sont protégées selon la concentration en glycérol. Dans l'état actuel de nos connaissances il est difficile de savoir pourquoi certaines cellules plutôt que d'autres bénéficient de cette protection qui devient totale pour 25 % de glycérol.

Il s'agit vraiment là d'un phénomène remarquable puisque, dans ces conditions optima, le tissu cardiaque peut subir des chocs thermiques de plus de $1\,000^{\circ}\text{C}$ et résister à des températures de -196°C , sans qu'aucune modification sensible soit apportée à son comportement physiologique ultérieur.

Influence des vitesses de congélation et de dégel. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons recherché quelle était l'influence des vitesses de congélation et de dégel sur le maintien de la viabilité.

Nous avons tout d'abord opéré dans les conditions optima, c'est-à-dire sur des fragments de tissus imprégnés 15 minutes dans du liquide d'Earle contenant 25 % de glycérol.

Vitesses de congélation. Le temps de congélation peut varier dans de très larges limites (0,16 s à plusieurs min.), sans qu'il apparaisse des différences sensibles, si le dégel est uniforme et rapide. Ces résultats concilient les points de vue de l'Ecole de Luyet et de celle de A. S. Parkes, qui sont respectivement partisans de congélations ultra-rapides et de congélations lentes. Nous n'avons pas pu mettre en évidence, pour ce matériel du moins, de phénomènes analogues au

« choc thermique » décrit par Smith [188], Polge [153], Rowson [154] et Lovelock [151].

Vitesses de dégel. Le temps de dégel, par contre, a une très grande importance et tout dégel lent produit une baisse considérable du degré de survie. Ceci concorde avec les résultats de Smith, Taylor et Luyet.

Si l'on s'écarte de l'optimum de concentration, on trouve des phénomènes analogues. Toutefois, si la congélation est effectuée par étapes et que, par exemple, on refroidit les tissus d'abord vers -30°C ou -60°C pendant 30 minutes avant de les immerger dans l'azote liquide, on constate que, pour la concentration de 5 % en glycérol, il se produit une diminution du degré de survie.

Influence de la durée de séjour aux basses températures. Lorsque le tissu est amené à -196°C , tous les processus d'évolution biologique et physicochimique, se trouvent bloqués comme nous le verrons plus loin. Il n'est donc pas étonnant de constater que sa durée de conservation est alors pratiquement indéfinie. Nous avons conservé de la sorte des fragments de tissus pendant plusieurs mois sans constater la moindre baisse d'activité après dégel. Des essais de conservation limitée à -80°C ont été satisfaisants, sauf dans quelques cas très précis que nous envisagerons ultérieurement.

Conclusion

Si nous envisageons l'ensemble des résultats fournis par la technique de culture de tissus, nous voyons que l'on peut garder vivant du tissu cardiaque après une congélation dans l'azote liquide suivie d'un dégel rapide, s'il a été imprégné, au préalable, par une solution physiologique contenant 25 % de glycérol. A l'état congelé, il est possible de le conserver indéfiniment. Nous avons donc là une méthode permettant de suspendre l'activité vitale pendant des durées de très loin supérieures à la vie entière de l'organisme d'où provient le tissu, et la portée scientifique et philosophique de ces faits a été soulignée maintes fois par Becquerel [5]. Les cellules se trouvent alors à l'état de « vie latente ou suspendue » et elles peuvent reprendre une activité physiologique normale après retour à la température de $+38^{\circ}\text{C}$. La méthode de culture de tissus nous a permis de le montrer.

Toutefois il peut, il doit subsister un doute. En effet, la culture de tissus, que l'on a souvent appelée avec raison, la culture de cellules, nous permet de savoir que les éléments constitutifs du tissu sont restés vivants et qu'apparemment leur activité physiologique n'a pas changé. On peut se demander, cependant,

si le séjour aux basses températures n'a pas provoqué quelques changements imperceptibles qui pourraient être responsables de modifications légères, permanentes ou transitoires, de leurs potentialités physiologiques. En d'autres termes, les cellules du tissu sont restées vivantes mais le tissu lui-même a-t-il conservé dans son ensemble sa physionomie initiale, ses caractères propres ? Les corrélations cellulaires ont-elles été modifiées ? Peut-on penser que les processus responsables de la différenciation d'un organe et régulateurs de sa fonction ont été perturbés ? Pour essayer de résoudre ce problème, nous nous sommes adressés à une technique, très voisine de la culture de tissus, mais dont l'esprit est fondamentalement différent : la culture d'organes. Nous avons cherché alors à voir, à la lumière des résultats précédents, si le cœur entier de l'embryon, envisagé en tant qu'organe, avait été modifié par l'action du froid.

Physiologie du cœur de l'embryon de poulet *in vitro* après congélation à très basse température

Selon les conditions de culture et la nature du milieu nutritif, un fragment de tissu peut évoluer *in vitro* selon trois directions principales dont chacune a fait l'objet d'une technique particulière : la culture de cellules, la culture de tissus et la culture d'organes (Fell H. B. [40]).

Dans la culture de cellules, on réalise la prolifération massive et très rapide d'un tissu non organisé, et le plus souvent dissocié en ses éléments cellulaires. Earle [39] et ses collaborateurs [177] ont donné une grande extension à cette méthode au cours des dernières années. Dans la plupart des cas, la culture a pour origine une cellule unique isolée dans un capillaire ou dans une gouttelette de milieu nutritif (Parker [141]).

Lorsque la croissance cellulaire est plus lente, le tissu de néoformation présente parfois d'intéressantes modifications histogénétiques. Il s'agit alors de la culture de tissus à laquelle nous avons fait appel lors de nos premières recherches. Toutefois, au bout d'un certain temps, le développement de la culture aboutit au morcellement et à la désintégration de l'explant initial. Ce dernier perd alors la plus grande partie, sinon la totalité de son unité et de son intégrité structurale.

Dans la culture d'organes, au contraire, le tissu conserve ses caractères originaux, voire même poursuit sa différenciation *in vitro*. Ceci est rendu possible par l'emploi de milieux beaucoup moins riches, assurant un niveau métabolique moyen qui favorise le maintien de l'organe dans sa forme initiale. Comme le souligne E. Wolff [215], cette technique « sauvegarde l'unité et la complexité structurale d'un ensemble, elle assure une alimentation modérée, mais suffisante, à ses différents éléments, sans favoriser, comme le font les techniques de culture de tissus, la prolifération explosive et néfaste, de l'une ou l'autre catégorie.

Techniques de cultures d'organes selon la méthode du Professeur Wolff



Figure 21. Vue générale de la table opératoire.

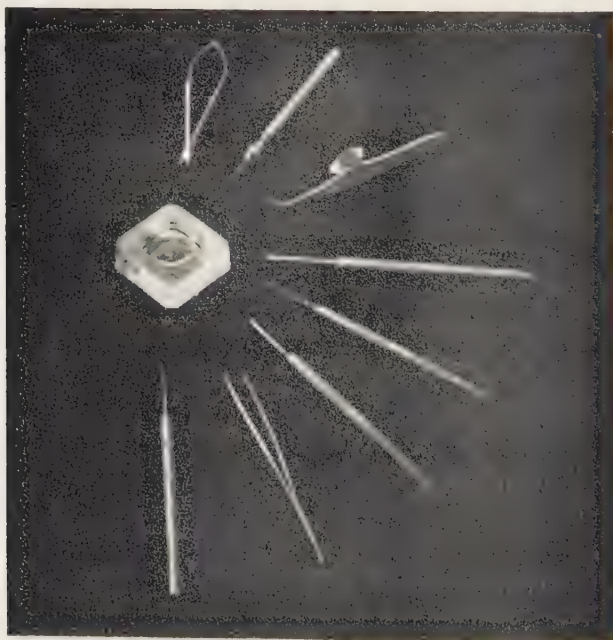


Figure 22. Instruments et récipient de culture.

Ainsi est maintenue l'intégrité de l'organe et son développement ultérieur est rendu possible ».

Depuis les premières observations de Thomson [207], la culture d'organes a fait l'objet de nombreuses recherches, et les travaux de Fell, Gaillard, Wolff, Martinovitch, Moscona, etc., lui ont donné un développement considérable. Des organes très différents provenant à la fois de poïkilothermes et d'homéothermes, ont été cultivés *in vitro*, dans le but soit d'observer leur fonctionnement physiologique, soit de suivre leur développement. Il convient toutefois de noter qu'il s'agit presque toujours d'expériences à court terme portant dans la plupart des cas sur quelques jours, ou une à deux semaines au plus. L'organe, par le fait même de sa masse et du maintien de son caractère compact, est relativement peu perméable aux substances nutritives, et si on le conserve trop longtemps il dégénère dans sa partie centrale. Toutefois, pendant les premiers jours, il présente un comportement physiologique normal et qui peut être facilement étudié. C'est dans cet esprit que nous avons abordé la culture d'organes, en nous fixant pour but d'étudier sur une période de 48 heures, la physiologie du cœur entier isolé, pour savoir dans quelle mesure l'exposition aux très basses températures pouvait modifier les processus physiologiques normaux.

I. Techniques

Nous avons utilisé la méthode décrite par Wolff et Haffen [216], en respectant des règles de stérilité identiques à celles de la culture de tissus. La préparation des milieux naturels ainsi que les diverses phases du traitement par les basses températures ont été les mêmes que celles que nous avons décrites précédemment. Nous nous bornerons donc à souligner brièvement les détails de technique particuliers à la culture d'organe.

1. PRÉLÈVEMENT DES ORGANES

La figure 21 montre la table de culture disposée dans la salle stérile. Les dissections sont effectuées stérilement sous contrôle d'un microscope stéréoscopique autoéclairant. Le prélèvement s'effectue à partir d'embryons de poulets de 7 jours, à l'aide d'instruments spéciaux (figure 22).

La figure 23 représente un embryon entier fixé sur de la paraffine noire sous une couche de liquide physiologique. La paroi abdominale a été ouverte pour montrer l'organisation interne. Le cœur est alors disséqué au niveau du sinus d'une part, et des gros vaisseaux efférents d'autre part, puis placé dans du liquide physiologique (figure 24).

Dissection du cœur de l'embryon de poulet



Figure 23. Embryon de 7 jours, après ouverture de la paroi ventrale. ($\times 5$).

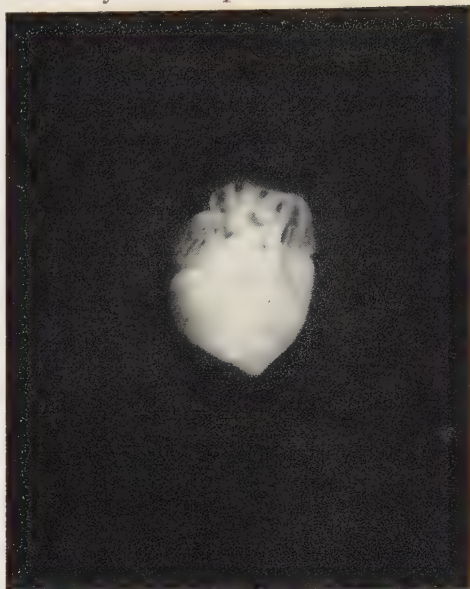


Figure 24. Cœur isolé monté en culture d'organe sur gélose nutritive. ($\times 14$).

2. EXPOSITION AUX BASSES TEMPÉRATURES

Après imprégnation par une solution contenant un pourcentage déterminé de glycérine, les cœurs sont congelés selon les techniques décrites précédemment. Par suite de la taille plus importante de l'organe, les durées du refroidissement et du réchauffement sont plus élevées. Le tableau suivant en donne les valeurs numériques.

<i>Préparation</i>	<i>Technique</i>	<i>Durée en secondes</i>
Thermocouple + cœur entier d'embryon de poulet de 7 jours, porté par un ruban d'aluminium	Congélation ultra-rapide dans le propane liquide	0,5
	Congélation très rapide dans l'azote liquide	1,5
	Congélation lente en tube	65
	Dégel très rapide dans le liquide d'Earle à $+ 20^{\circ}\text{C}$	1,0
	Dégel lent par immersion du tube dans l'eau à $+ 20^{\circ}\text{C}$	2 mn
	Dégel très lent par réchauffement du tube à l'air libre	6 à 7 mn

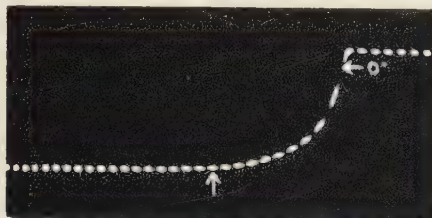
Les figures 25 et 26 montrent les courbes thermiques correspondantes.

Evaluation des vitesses de congélation et de dégel de cœurs d'embryon de poulet de 7 jours, imprégnés dans du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol (EG R₃₀) — (Couple cuivre-constantan). Chaque trait représente 1/20 de s.

AZOTE LIQUIDE



Congélation

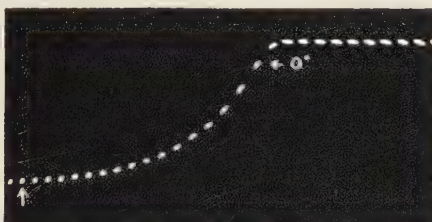


Dégel

PROPANE LIQUIDE



Congélation



Dégel

Figure 25. Congélation rapide sur ruban d'aluminium, suivie de dégel rapide dans une solution physiologique à + 20° C.

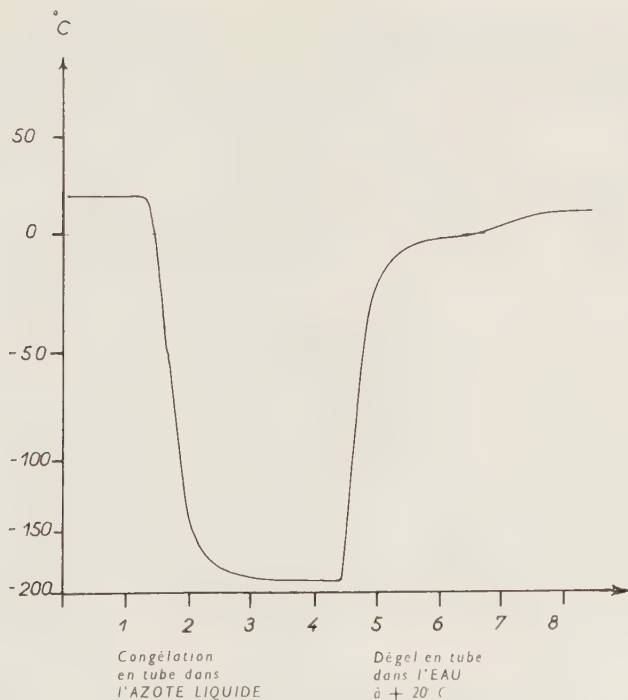


Figure 26. Congélation et dégel lents en tube, (Le temps est indiqué en minutes.)

3. MISE EN CULTURE

Après congélation et dégel, les cœurs sont implantés à la surface du milieu solide de Wolff et Haffen, contenu dans une « salière embryologique » et composé de :

Solution physiologique d'agar-agar à 1 % dans le liquide d'Earle.....	6 gouttes
Extrait embryonnaire EE 50	3 —
Solution d'Earle rouge.....	3 —
Pénicilline (sel de sodium).....	150 U. I.
Streptomycine	150 —

Les précautions usuelles sont prises en implantant l'organe : on évite d'entailler le milieu et l'on essore soigneusement les explants à l'aide de pipettes capillaires et de fragments de papier-filtre stériles. La « salière » est alors scellée hermétiquement à la paraffine.

4. INCUBATION ET EXAMENS

Les cœurs sont incubés à 37° C et examinés deux fois par jour. On note l'activité physiologique de l'organe ainsi que le pH du milieu de culture. La sensibilité thermique est également évaluée. Des contrôles histologiques sont effectués à intervalles réguliers.

A. Activité physiologique

Pour apprécier le degré de conservation des cœurs après congélation, nous avons établi une échelle arbitraire d'activité physiologique valable pour des cœurs observés à + 37° C.

<i>Niveau d'activité</i>	<i>Critère utilisé</i>
1	Aucune activité apparente
2	Battements de points ventriculaires isolés
3	Battements d'un seul ventricule ou de la pointe du cœur
4	Battements des deux ventricules
5	Battements des ventricules et des oreillettes
7	Battements successifs et coordonnés des ventricules et des oreillettes

B. pH

La présence de rouge de phénol dans le milieu de culture permet une détermination colorimétrique du pH entre 5,8 et 7,5.

C. Sensibilité thermique

Pour certains cœurs nous avons étudié la sensibilité thermique en comptant la fréquence des battements en fonction de la température. En pratique la « salière » est immergée dans un bain thermostatique dont la température peut varier de 30° C à 40° C. Le nombre des battements est déterminé en prenant la moyenne de 4 comptages de 20 battements chacun. Ce test a essentiellement une valeur comparative. En effet, la fréquence propre des battements varie sensiblement d'un cœur à l'autre. Ceci semble résulter de différences minimales dans le processus de prélèvement. Par contre, l'aspect de la courbe obtenue représente un critère statistiquement valable. Cette variation est d'ailleurs le plus souvent linéaire entre 32° et 36° C.

D. Histologie

Les cœurs sont lavés pendant 1/2 heure dans trois bains successifs de liquide d'Earle, puis fixés soit avec le liquide de Zenker, soit avec le liquide d'Earle contenant 10 % de formol Codex. Les colorations utilisées ont été : hemalun-éosine, hématoxyline-éosine, trichromique de Masson.

II. Comportement *in vitro* du cœur de l'embryon de poulet

1. CŒURS TÉMOINS NON CONGELÉS

Nous avons vu précédemment que le tissu cardiaque était doué de la propriété de contraction et que ces battements pouvaient durer pendant très longtemps (Congdon [34], Hogue [71], Levaditi [88], Olivo [130, 134], De Renyi [165]). Les éléments cellulaires isolés eux-mêmes présentent des contractions rythmiques (Garofolini [50]). Lorsque ces cellules viennent en contact, un certain synchronisme s'établit entre les diverses pulsations (Mayehara [109]) dont le rythme dépend de nombreux facteurs, facteurs extrinsèques comme l'intensité de croissance et facteurs intrinsèques comme la provenance anatomique de l'explant (Hibuse [67, 68]).

La propriété inotrope du cœur découle normalement de la contractilité de ses éléments cellulaires et de très nombreux travaux ont été consacrés à ce sujet. Le cœur commence à se contracter dès la 33^e heure de la vie embryonnaire. C'est dans la paroi myocardique du ventricule droit que débute la contraction. D'abord localisée à la partie postérieure de la région ventriculaire, elle s'étend plus antérieurement par la suite. Lentes et intermittentes au départ, environ 8 par minute, les pulsations qui sont initialement d'origine myogénique (Hamilton [59]), ne tardent pas à prendre une forme péristaltique et deviennent continues. Au fur et à mesure que l'atrium se développe, il commence à se contracter

selon un rythme plus rapide qui s'accélélera encore lorsque le sinus veineux sera formé et aura commencé également à se contracter. L'ensemble des battements semble alors dominé par le sinus veineux, chaque contraction prenant son origine dans la partie postérieure du cœur (Patten et Kramer [145]). Au bout de trois jours, le rythme est de 128 par minute à 38° C, il atteint 200 à 7 jours, puis se stabilise vers 190-200 durant le reste du développement (Romanoff [174]).

Lorsque le cœur est séparé de l'organisme et placé *in vitro*, il continue à battre régulièrement. La fréquence de ces battements est variable, mais demeure entre des limites assez précises (Lewis [90]). Comme pour le tissu cardiaque cultivé en culture de tissus, des facteurs extrinsèques et intrinsèques peuvent intervenir. La composition du milieu et en particulier la teneur en sels (Lewis [92]), influe sur le rythme des contractions. Quant aux facteurs intrinsèques, ils continuent à jouer un très grand rôle et au bout de 48 heures de culture, on peut toujours mettre en évidence la dominance sino-atriale (Paff [137]). Ceci prouve de manière éclatante que la culture d'organes conserve l'organe dans sa plus parfaite intégrité et ne modifie pas son comportement physiologique normal. Ces battements peuvent durer plusieurs jours et nous avons noté pour des cœurs d'embryons de 7 jours et demi, une fréquence de battements de 40 par minute à 34° C, au bout de 24 heures de culture.

Des mesures reproductibles peuvent avoir lieu pendant 48 heures. Au-delà, la culture vieillit, le milieu s'épuise et il devient acide. On atteint un pH de 5,8 en 48 heures. L'abondance des substances de déchet du métabolisme provoque alors un début de nécrose dans la partie centrale de l'organe et les résultats deviennent inconsistants. C'est pourquoi nous nous sommes limités à des expériences n'excédant pas trois jours.

Des coupes histologiques pratiquées dans les cœurs après 24 heures de culture, montrent une conservation parfaite des cellules. Au bout de 48 heures, on note quelques noyaux picnotiques dans le centre de l'explant.

2. CŒURS CONGELÉS

Les expériences que nous avons réalisées dans ce domaine ont été faites à la lumière des résultats fournis par la culture de tissus. Nous nous sommes donc limités à l'étude des conditions optima de congélation et de dégel compatibles avec la survie de cœurs préalablement imprégnés par une solution physiologique contenant du glycérol.

Nous ne reprendrons donc pas les explications détaillées données à l'occasion de la culture de tissus et nous nous bornerons à exposer brièvement les résultats plus particuliers à la culture d'organes.

Préparations histologiques fixées et colorées (Zenker — Hématoxyline — Erythrosine) de cœurs d'embryon de poulet cultivés 24 h *in vitro*, après imprégnation préalable par du liquide d'Earle contenant différents pourcentages de glycérol, suivie de congélation dans l'azote liquide.

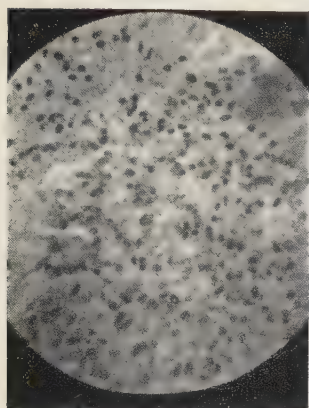


Figure 27. Cœur témoin traité par le liquide d'Earle seul.

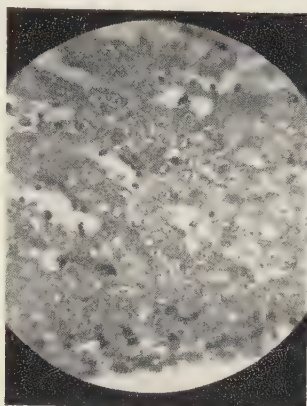


Figure 29. Cœur imprégné par du liquide d'Earle contenant 20 % de glycérol.

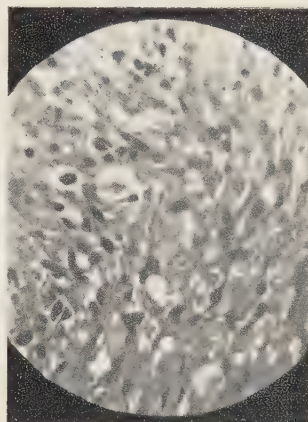


Figure 30. Cœur imprégné par du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol. Obj. imm. Homog. $\times 500$.

A. Influence de la concentration en glycérol

Nous avons obtenu des résultats identiques à ceux qui ont été fournis par la culture de tissus. Une imprégnation préalable par une solution physiologique contenant un certain pourcentage de glycérine est nécessaire au maintien de la viabilité et les noyaux cellulaires sont picnotiques (figure 27) en l'absence de glycérol. En effet, quelles que soient les vitesses de congélation et de dégel, aucun cœur non imprégné n'a pu survivre. Il existe d'ailleurs un optimum dans la concentration de glycérol, qui se situe aux alentours de 30 % en poids. La durée d'imprégnation nécessaire est voisine de 30 minutes, et des expériences de contrôle nous ont montré qu'il n'y avait pas d'action toxique apparente même après un séjour de 1 ou 2 heures dans une solution glycérulée concentrée. Nous retrouvons donc là, pour l'organe entier, des exigences identiques à celles du tissu cardiaque proprement dit.

Pour étudier de manière plus précise le pouvoir protecteur de la glycérine, nous avons adopté un processus standard de congélation et de dégel. La congélation est effectuée en tube, en 65 secondes environ. Elle est suivie d'un dégel très rapide réalisé par immersion directe des cœurs dans le liquide d'imprégnation à la température ambiante (-20°C). Les explants sont alors mis en culture soit

Variation de l'activité physiologique du cœur entier de l'embryon de poulet, en fonction de la concentration en glycérol du liquide d'impregnation préalable. Culture incubée à $+38^{\circ}\text{C}$. L'activité physiologique comporte 6 niveaux successifs : 1 — aucune activité ; 2 — battements de points ventriculaires isolés ; 3 — battements d'un seul ventricule ; 4 — battements des deux ventricules ; 5 — battements des oreillettes et des ventricules ; 6 — battements coordonnés des oreillettes et des ventricules.

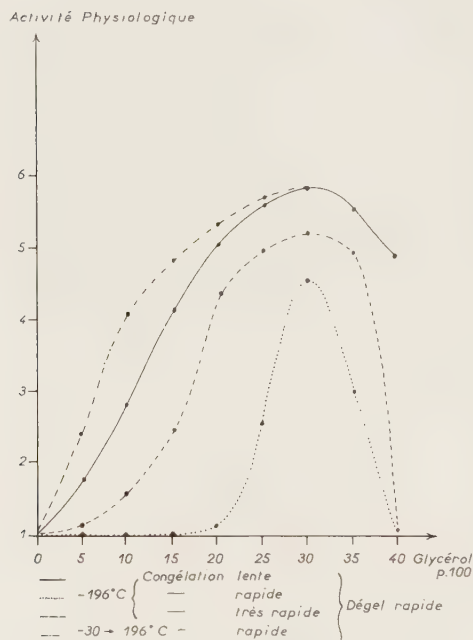


Figure 28. Variation de l'activité physiologique en fonction des vitesses de congélation. Dégel rapide uniforme. Congélation lente : en tube dans l'azote liquide (65 s). Congélation rapide : sur ruban d'aluminium dans l'azote liquide (1,5 s). Congélation très rapide : sur ruban d'aluminium dans le propane liquide à -196°C (0,5 s). Congélation en tube à -30°C dans l'enceinte isotherme (40 s), puis à -196°C dans l'azote liquide (20 s).

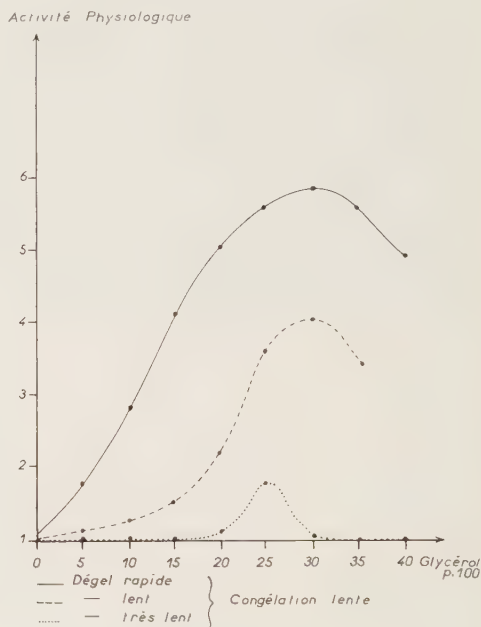


Figure 28. Variation de l'activité physiologique en fonction des vitesses de dégel. Congélation lente uniforme. Dégel rapide : immersion directe dans du liquide d'Earle à $+20^{\circ}\text{C}$ (1 s). Dégel lent : immersion du tube contenant les cœurs congelés dans l'eau à $+20^{\circ}\text{C}$ (45 s à 2 mn). Dégel très lent : réchauffement du tube à l'air libre (6 mn).

directement, soit après passage dans du liquide physiologique à $+20^{\circ}\text{C}$, pendant une demi-heure dans le but d'éliminer le glycérol.

Au bout de 24 et 48 heures, les cultures sont examinées et les résultats lus

selon les méthodes décrites précédemment, sont traduits graphiquement (figure 28). La courbe montre qu'en dehors de l'optimum, les cœurs, préalablement imprégnés par des solutions contenant différents pourcentages de glycérol, présentent des degrés d'activité variés.

a) *Cœurs traités par des solutions physiologiques contenant 5 à 7 % de glycérol.* Pour 5 % de glycérol, les cœurs ne montrent pas d'activité physiologique. Ils ont un aspect plat, blanchâtre, opaque... Pour 10 % de glycérol, l'aspect macroscopique est très voisin, toutefois on note de légères contractions du sommet des ventricules.

b) *Cœurs traités par des solutions physiologiques contenant 10 à 20 % de glycérol.* A 15 % de glycérol, les battements sont réguliers et intéressent à la fois les deux ventricules, parfois une oreillette. Pour 20 %, on note des contractions régulières auriculo-ventriculaires. La coupe histologique révèle une très grande quantité de cellules en bon état, mais il subsiste encore de nombreux noyaux picnotiques (figure 31).

c) *Cœurs traités par des solutions physiologiques contenant 20 à 40 % de glycérol.* Les résultats sont alors excellents. Les cœurs manifestent une activité physiologique normale. Ils ont un aspect luisant et transparent caractéristique, et sont parfaitement cambrés. A 30 %, on observe très souvent un synchronisme et une coordination des mouvements auriculo-ventriculaires. Le degré de conservation est parfait et il est parfois très difficile de différencier une préparation témoin d'une préparation congelée. Le métabolisme du cœur *in vitro* semble normal et le pH du milieu de culture évolue comme celui des témoins. La sensibilité thermique est également normale et la fréquence de battements voisine de 40 par minute pour 34° C au bout de 24 heures. La seule différence que l'on puisse signaler tient à l'existence d'un certain temps de latence pour l'organe congelé. Le retour à l'activité physiologique normale n'est pas instantané et demande plusieurs heures. L'examen histologique montre une structure normale (figure 30). Par contre, pour des teneurs supérieures à 30 %, il semble que le glycérol soit toxique ou, du moins, qu'il exerce une action inhibitrice sur l'activité physiologique.

L'ensemble de ces résultats montre donc que, pour une concentration adéquate de glycérol dans le liquide d'imprégnation, il est possible de congeler des cœurs d'embryons de poulet de 7 jours à très basse température et de les dégeler ultérieurement sans modifier leur fonctionnement physiologique. Les cellules restent donc vivantes et de plus conservent l'intégralité de leurs potentialités.

Les méthodes de congélation qui ont été décrites par différents auteurs n'avaient permis jusqu'alors, que des survies de courte durée où le plus souvent

l'organe avait une activité physiologique réduite ou anormale (Gonzalez et Luyet [56], Luyet et Gonzalez [105]).

B. Influence des vitesses de congélation et de dégel

De même que nous l'avons fait pour les expériences de culture de tissus nous avons voulu rechercher quelle était l'influence des vitesses de congélation et de dégel sur le maintien de l'activité physiologique.

a) Vitesses de congélation. Les techniques de congélation utilisées ont été identiques à celles que nous avons employées pour les fragments cardiaques. La lecture des résultats a été faite au bout de 24 heures et la figure 28 en donne la traduction graphique. On peut voir que lorsque la concentration en glycérol du liquide d'imprégnation est voisine de l'optimum, la vitesse de congélation peut varier dans de larges limites sans que cela s'accompagne d'une diminution sensible de l'activité physiologique. Toutefois, pour des vitesses extrêmement élevées (propane liquide direct et azote liquide direct), il semble qu'il y ait une baisse de l'activité physiologique. Nous avons pu relier cette diminution au fait que, lors de ces congélations très rapides, il se produit des craquelures et des lésions anatomiques importantes du cœur. Ceci permet, peut-être, de mieux comprendre le caractère particulier de notre test en cultures d'organes. En effet, la culture de tissus ne montrait pas de différences entre les fragments congelés lentement ou très rapidement après une imprégnation optima : la technique se bornait alors à constater que la vie cellulaire était sauvegardée. Par contre, le test en culture d'organes nécessite, pour être positif, que la fonction de l'organe soit préservée, en d'autres mots, que les rapports des cellules entre elles n'aient pas été modifiés. Il est bien évident qu'une lésion anatomique étendue entraîne alors inévitablement une baisse d'activité.

En dehors de la concentration de 30 %, et pour les concentrations en glycérol inférieures ou supérieures à l'optimum, la congélation diminue considérablement l'activité physiologique et il semble alors que les meilleurs résultats soient obtenus par une congélation lente procédant par étapes. Le phénomène est particulièrement net pour les concentrations en glycérol comprises entre 7,5 et 20%.

Ces résultats sont en accord avec les récentes observations de Luyet [102] et Polge [156] qui ont en effet souligné tout l'intérêt que l'on pouvait attacher à la méthode du *two-steps freezing* dans laquelle la deuxième congélation à basse température est relativement lente et où elle est précédée par un refroidissement rapide aux alentours de -30°C .

b) Vitesses de dégel. Les expériences de culture de tissus nous ont montré qu'un dégel rapide semblait indispensable au maintien de la vie. Nous avons voulu

analyser de plus près, à l'aide de la culture d'organes, l'influence du réchauffement.

Des cœurs ayant subi une congélation lente sont dégelés selon trois méthodes différentes : un dégel rapide : par immersion directe du ruban d'aluminium portant les tissus dans la solution d'imprégnation à $+ 20^{\circ}\text{C}$ (durée : 0, 5 s à 1 s) ; un dégel lent : par immersion du tube qui contient la lamelle supportant les cœurs, dans de l'eau à $+ 20^{\circ}\text{C}$ (durée : 45 s — 85 s) ; un dégel très lent : où l'on laisse le tube se réchauffer progressivement à l'air (durée : 6-7 minutes).

Comme l'indique la figure 81, le maintien de l'activité physiologique dépend très étroitement de la vitesse de dégel et tous les dégels lents conduisent inéluctablement à la mort du tissu. Ce phénomène est d'autant plus sensible que l'on s'écarte de l'optimum d'imprégnation. Il se produit d'ailleurs pour les faibles vitesses de dégel, un léger déplacement de cet optimum, ce qui semble indiquer que les concentrations élevées de glycérol deviennent toxiques au cours d'un réchauffement trop lent.

C. Evolution à basse température

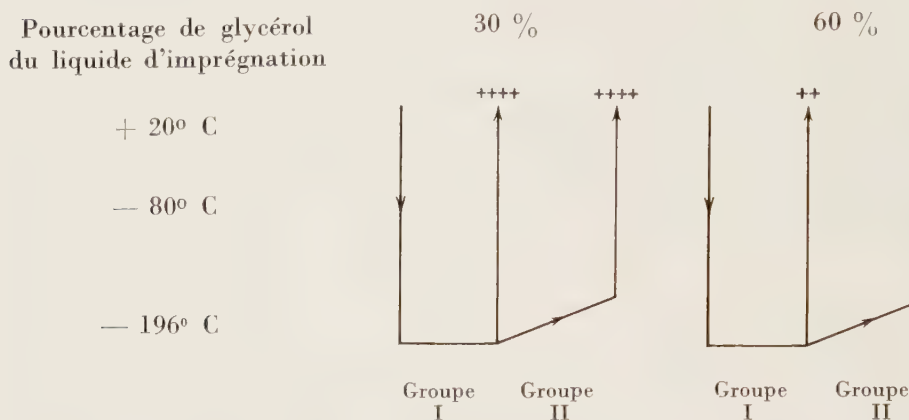
Après avoir étudié séparément les problèmes de congélation et de dégel, nous avons voulu connaître s'il y avait évolution au cours du séjour à basse température. Ainsi que nous l'avons signalé à propos de la culture de tissus (p. 38), la conservation de longue durée dans l'azote liquide ne pose pas de problèmes. Nous avons pu conserver, de même, des cœurs imprégnés par 30 % de glycérol dans la neige carbonique à $+ 80^{\circ}\text{C}$. Toutefois, lorsque la teneur en glycérine augmente, les résultats sont sensiblement différents. Pour donner un aperçu de ce qui peut se produire à basse température à l'intérieur d'un tissu congelé, nous analyserons brièvement l'expérience suivante : deux séries de cœurs d'embryons de poulets de 7 jours et demi sont imprégnés pendant 30 minutes par deux solutions physiologiques contenant respectivement 30 % et 60 % de glycérol, puis congelés lentement jusqu'à la température de l'azote liquide, à $- 196^{\circ}\text{C}$, où ils séjournent pendant une heure.

Un premier groupe de cœurs est alors dégelé rapidement puis mis en culture. Au bout de 24 heures, on constate que les cœurs préalablement imprégnés par 30 % de glycérol, ont une activité physiologique normale (niveau 6) et que ceux qui ont été imprégnés par 60 % de glycérol sont également vivants bien qu'ils manifestent une activité physiologique moins élevée (niveau d'activité 3).

Un deuxième groupe de cœurs est réchauffé progressivement de $- 196^{\circ}\text{C}$ à $- 80^{\circ}\text{C}$, en l'espace de deux heures. Il convient de noter qu'au cours, de ce réchauffement, l'aspect général des spécimens congelés ne varie pas si ce n'est

un léger changement de couleur des cœurs imprégnés par 60 % de glycérol. Lorsque la température de -80°C est atteinte, les cœurs sont alors dégelés rapidement puis mis en culture.

Au bout de 24 heures, les résultats sont les suivants : les cœurs imprégnés par 30 % de glycérol sont parfaitement vivants (niveau d'activité 6). Par contre, les cœurs imprégnés par 60 % apparaissent morts. Le tableau ci-dessous schématise l'ensemble de l'expérience.



Un séjour prolongé à certaines températures peut donc être léthal pour des concentrations données en glycérol du liquide d'imprégnation. Nous verrons plus loin comment on peut interpréter par la physico-chimie, l'action nocive du réchauffement progressif de -196°C à -80°C . Toutefois, nous pouvons dès maintenant souligner un fait qui nous apparaît comme primordial dans l'ensemble de nos recherches : la température à laquelle séjourne un tissu a une importance considérable sur ses possibilités de survie, même s'il est totalement congelé. Nous venons de voir, en effet, que le passage de -196°C à -80°C peut, dans certains cas, être léthal et, cependant, à -80°C comme à -196°C , les cœurs sont entièrement solides et rien ne permet de penser, à première vue, qu'ils sont susceptibles de subir une évolution interne au cours du réchauffement. Il est nécessaire, pourtant, d'admettre qu'ils ont évolué dans cet intervalle de température, si l'on veut justifier les résultats expérimentaux (figure 32).

Conclusion

La culture de tissus nous avait permis de conclure à la possibilité de survie des cellules du tissu cardiaque, après exposition à de très basses températures (Rey [168]). Une imprégnation préalable par du glycérol leur permettait en

effet d'éviter les effets mortels de la congélation et du dégel. La culture d'organes, tout en précisant certaines des conditions de survie, vient de nous montrer que pour des conditions optima d'imprégnation, de congélation, de stockage et de dégel, un organe entier, comme le cœur, pouvait conserver son activité vitale et montrer à nouveau un fonctionnement physiologique normal lorsque la température était revenue à $+ 37^{\circ}\text{C}$ (Rey [171]). Le tissu cardiaque a donc gardé toutes ses potentialités physiologiques et les corrélations cellulaires n'ont pas été

Activité Physiologique

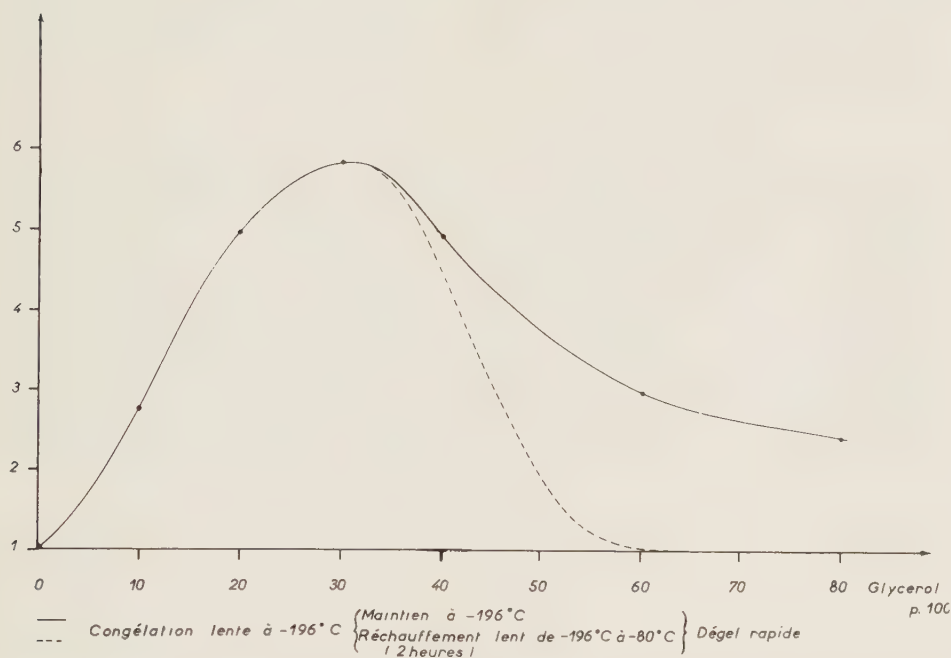


Figure 32. Cœurs d'embryon de poulet. Etude des altérations produites à très basse température dans les tissus congelés après une imprégnation préalable par de hautes concentrations en glycérol.

modifiées. Il est donc permis d'affirmer qu'un organe d'homéotherme peut, dans certaines conditions, supporter un abaissement de température considérable et conserver son intégrité morphologique et fonctionnelle.

Il n'est pas impossible, dès lors, de prévoir la conservation de très longue durée d'organes entiers, voire même de portions d'organismes, et les conclusions que l'on peut en tirer sur le plan pratique sont fort nombreuses ; nous les envisagerons brièvement à la fin de ce travail.

S'il est vrai que l'on peut conserver un organe entier sans modifier son rôle fonctionnel, on doit toutefois envisager son devenir et savoir si le séjour aux basses températures n'introduit pas de faibles altérations susceptibles d'entraîner des changements physiologiques importants au bout de longues périodes. Après avoir vérifié que les éléments cellulaires étaient restés vivants et que leurs diverses corrélations n'avaient pas été modifiées, c'est-à-dire que l'organe avait conservé sa fonction, il convenait donc de vérifier si les tissus congelés et dégelés étaient stables au cours du temps et s'ils ne montraient pas d'évolution anormale lointaine.

Du point de vue expérimental, le problème ainsi posé, est très différent. Aucune technique *in vitro* en effet, n'est susceptible d'assurer le maintien d'un organe pendant une longue durée dans des conditions normales de fonctionnement. Il faut donc s'adresser à l'animal directement et suivre l'évolution du tissu congelé *in vivo*.

Divers travaux ont été réalisés dans cette direction, plus particulièrement sur le tissu endocrinien. Parkes [142], Smith [192], Deansley [35] et leurs collaborateurs ont ainsi montré que de l'ovaire et du testicule congelés pouvaient donner lieu à des greffes permanentes et fonctionnelles.

Il n'était pas question dans notre travail de poursuivre l'expérimentation sur le cœur, sous cette incidence, mais pour ne pas trop nous éloigner de nos premières expériences, nous avons écarté les tissus endocriniens et nous nous sommes intéressés à la peau. Nous avons donc recherché les conditions de survie de la peau congelée et nous avons étudié son comportement de longue durée *in vivo*, tout en nous orientant, de façon constante, d'après les résultats des études *in vitro*.

La survie de la peau après exposition aux basses températures. Expériences de greffes chez le rat et la souris

La conservation de la peau par le froid constitue une méthode relativement récente en chirurgie plastique. Elle doit ses premiers succès aux travaux de Webster [213]. Le plus souvent il s'est agi de conservation soit à des températures relativement élevées ($+ 20^{\circ}\text{C}$), soit au contraire de stockage à l'état desséché après lyophilisation. Au cours des cinq dernières années, de très nombreuses recherches ont été réalisées dans ce domaine, sous l'impulsion notamment de Hyatt et de son équipe [74]. Elles ont d'ailleurs fait l'objet de diverses mises au point où les auteurs ont pu affronter leurs thèses et leurs expériences (Hyatt [75], Hemphill [62], Taylor, Gerstner et Converse [205].

En dehors du domaine clinique, un certain nombre de travaux ont été réalisés sur l'animal, en particulier par Taylor [202, 206], Billingham [12] et Kreyberg [84 à 86], mais leur orientation a été dans l'ensemble d'inspiration médicale en ce sens qu'ils visaient presque tous, à préciser les conditions optima d'utilisation chirurgicale de la peau conservée. Dans la plupart des cas, la réalisation de greffes de peau a été associée au problème plus général de la création et de l'utilisation des *Banques de Tissus*.

De ce fait même, et dans la mesure où un appel de plus en plus large a été fait aux tissus conservés, la question plus générale des homogreffes avec son cortège de problèmes d'ordre immunologique, s'est trouvée liée aux greffes cutanées.

Il n'était pas dans notre intention d'aborder l'ensemble de ce sujet si complexe et nous avons voulu nous limiter à l'étude expérimentale de la conservation de la peau par les basses températures en vue de son utilisation chez l'animal pour la réalisation d'autogreffes orthotopiques. Nous nous sommes ensuite simplement bornés à soulever le problème des homogreffes pour signaler dans quelle mesure

les basses températures pouvaient y jouer un rôle important. Pour des raisons de commodité, tenant principalement à la facilité d'obtention de lots identiques et à la simplicité opératoire, nous avons travaillé sur le rat et la souris.

I. Techniques

1. GÉNÉRALITÉS

La méthode expérimentale que nous avons suivie pour l'ensemble de ces recherches peut être schématisée de la manière suivante. La peau de la région dorsale d'un rat ou d'une souris est prélevée aseptiquement et sous anesthésie générale, puis lavée dans une solution physiologique. Elle est alors soumise à l'action des basses températures, avec ou sans imprégnation préalable, puis greffée après dégel sur la région cutanée de l'animal dont elle provient.

Il s'agit donc d'une autogreffe orthotopique puisque le greffon provient de l'animal sur lequel il est placé et qu'il occupe une position anatomique normale. Elle peut être réalisée sans déplacement ou avec déplacement, selon que la greffe est faite sur la région du prélèvement ou à un emplacement différent. Cette technique de greffe se rapproche de celles qui ont été décrites par Taylor et Lehrfeld [206], Woodruff et Simpson [217], Bilingham [14,11] et Skoog [186]. Elle diffère par contre complètement de la méthode de Kivilaakso [80] qui consiste à implanter la peau dans la cavité abdominale en la cousant au péritoine et aux trois couches musculaires de la paroi de l'abdomen. Il s'agit là en effet, d'une autogreffe enfouie dont l'évolution n'est pas du tout semblable à celle de l'autogreffe orthotopique.

Par suite de faibles divergences dans les détails opératoires, nous décrirons très brièvement la technique dans le cas du rat et dans le cas de la souris.

2. TECHNIQUE DE GREFFE DE PEAU CHEZ LE RAT

L'animal est attaché par la face ventrale sur une planchette, après anesthésie générale. Nous avons employé indifféremment le chloral (30 mg/kg), le nembutal (70 mg/kg) intrapéritonéaux, ou l'éther par voie respiratoire. La peau épilée ou mieux, rasée électriquement est soigneusement lavée à l'eau savonneuse, puis à l'alcool. Des champs opératoires sont placés autour de la zone de greffe (figure 33).

Nous avons utilisé des greffons dermo-épidermiques épais, parfois appelés greffons de peau totale, ainsi que des greffons dermo-épidermiques minces.

A. Greffons épais

Un rectangle de peau de 20 mm sur 15 mm environ est découpé sur la région dorsale à l'aide d'un bistouri et de ciseaux fins, puis détaché par clivage au

Technique de greffes cutanées chez le rat



Figure 33. Préparation du champ opératoire.



Figure 34. Prélèvement d'un greffon épais.

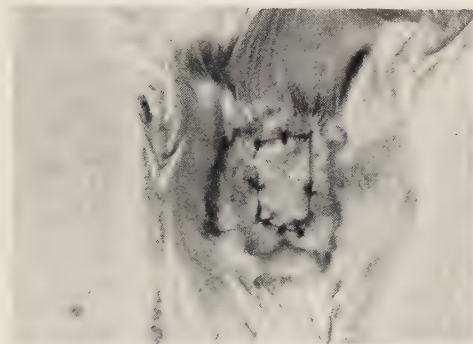


Figure 35. Le greffon est remis en place après traitement.



Figure 36. L'animal et son pansement.

niveau de l'aponévrose. La peau comprend alors l'épiderme, le derme et le tissu conjonctivo-musculaire sous-cutané y compris le *panculus carnosus* (figure 34). Le greffon est débarrassé de la couche musculaire sous-cutanée avec un scalpel, puis lavé dans du liquide physiologique à $+ 20^{\circ}\text{C}$ contenant 1.000.000 d'unités de pénicilline et 1 gramme de streptomycine par litre. Il est alors congelé et dégelé selon les méthodes décrites précédemment puis remis en place sur un *lit* préparé de manière identique. Le *lit* est ajusté de telle façon que le greffon, qui repose directement sur l'aponévrose, s'adapte exactement aux bords de la plaie (*fitted graft* de Medawar [112,14]), auxquels il est cousu par des points de soie interrompus. L'ensemble de la zone de greffe est recouvert par un tulle gras stérile, puis par deux compresses stériles. Une bande adhésive perforée, recouverte par un pansement élastique assure la protection du greffon (figures 35 et 36).

B. Greffons dermo-épidermiques minces

Très souvent les greffons épais ne donnent pas de résultats satisfaisants par suite de la difficulté de revascularisation de la zone de greffe. Cet inconvénient a été signalé par Taylor et Woodruff et nous l'avons également retrouvé. C'est pourquoi nous avons préféré réaliser des greffes dermo-épidermiques minces.

Une dissection soigneuse permet de séparer l'ensemble dermo-épidermique du *paniculus carnosus*. Cette opération est relativement délicate car, contrairement aux autres animaux de laboratoire, il n'y a pas, chez le rat, de plan de clivage naturel entre le derme et le *paniculus carnosus*. Généralement, en effet, le derme est bordé par une *fascia superficialis* qui constitue une véritable aponévrose et limite le tégument dans sa partie profonde (Policard [157]). Chez le rat au contraire, il faut réaliser avec le scalpel une zone de clivage artificielle à l'intérieur de l'hypoderme tout en respectant la vascularisation profonde. En effet, les gros vaisseaux courant dans le tissu cellulaire sous-cutané, pénètrent dans la zone hypodermique pour donner un réseau sous-dermique, passant à la surface du *paniculus carnosus*, le réseau planiforme profond de distribution de Renaut (Policard [157]) également appelé *rete cutaneum* et dont il convient de respecter l'intégrité. Le réseau sus-dermique, ou réseau planiforme anastomotique sous-papillaire de Renaut, soit encore *rete subpapillare*, sera quant à lui séparé de la vascularisation sous-dermique au cours de la dissection. L'hémorragie est cependant très limitée par suite du faible calibre des vaisseaux intradermiques.

Le greffon ainsi prélevé contient donc d'une part l'épiderme (couche cornée, assise précornée, corps muqueux de Malpighi et assise germinative) et le derme, soit l'ensemble de la couche réticulaire avec les papilles dermiques, le derme *sensu stricto* avec ses fibres collagènes, élastiques et réticulaires, ainsi que la partie superficielle de l'hypoderme. Il est possible de réaliser le prélèvement d'une manière automatique à l'aide d'un dermatome (Woodruff [217]). Nous ne l'avons pas utilisé et tous nos greffons ont été détachés au scalpel et au rasoir.

Les opérations ultérieures de lavage, imprégnation, congélation et dégel, sont faites comme précédemment. Au moment de la greffe, on dépose le greffon traité sur un *lit* préparé de manière à respecter la vascularisation sous-dermique, c'est-à-dire selon une technique identique à celle du prélèvement du greffon. Après fixation du tissu par des points de suture, le pansement final est alors réalisé selon la méthode habituelle. Tous les animaux sont placés en cages individuelles pour éviter qu'ils ne détruisent la greffe.

3. TECHNIQUE DE GREFFES DE PEAU CHEZ LA SOURIS

Par suite de la présence d'un clivage naturel du derme au niveau du *paniculus carnosus* chez la souris, la technique se trouve considérablement simplifiée. Nous avons utilisé la méthode de Billingham [13].

A. Prélèvement du greffon

Les animaux sont endormis par piqure intrapéritonéale de Nembutal. La peau, rasée, lavée et aseptisée est soulevée à l'aide d'une aiguille ou d'un crochet, et d'un coup de ciseaux on détache un disque de peau dont l'épaisseur est décroissante du centre à la périphérie (*pinch-graft*). Ce disque est alors retourné sur une plaque de verre et à l'aide d'un scalpel et de pinces fines, on réalise le clivage de la zone dermo-épidermique et du *panculus carnosus*. Le greffon est alors prêt pour le traitement thermique.

B. Préparation du lit de greffe

La préparation du *lit* se fait en un endroit différent de la peau par suite des conditions particulières de prélèvement. Toutes les autogreffes orthotopiques réalisées chez la souris ont donc été faites avec déplacement. La technique employée ici est la même que celle qui a été utilisée chez le rat.

C. Réalisation de la greffe

Par suite de la faible taille des greffons (4 à 6 mm), on ne fait aucun point de fixation. Le greffon est déposé sur le *lit* qu'il recouvre exactement. Dans quelques cas, il a été implanté au centre d'une aire plus large. (*Open-style grafts* de Medawar [14,112].) Le pansement est fait de la même manière, mais la bande adhésive est ici remplacée par une bande plâtrée qui assure une meilleure contention. Pour éviter un refroidissement excessif des animaux dû à l'humidité du plâtre s'ajoutant à l'effet hypothermisant du barbiturique, les souris sont placées dans une étuve à 30° C pendant une heure avant d'être remises en cage individuelle.

4. MÉTHODES D'OBSERVATION

Pour éviter une chute mécanique précoce du greffon, le pansement est conservé pendant une période de 8 à 12 jours en général. La zone de greffe est alors observée soigneusement au microscope binoculaire et l'on note la forme, la couleur et la souplesse du greffon, ainsi que la reprise de croissance des poils. Des examens réguliers ont lieu pendant plusieurs mois. Enfin, au bout de plus d'un an dans certains cas, au bout de six mois seulement dans d'autres, l'animal est sacrifié et la peau prélevée, fixée et préparée pour le contrôle histologique. Le liquide de Hollande est employé comme fixateur et le trichromique de Masson comme coloration combinée.

II. Evolution des autogreffes de peau normales et congelées

Près de 500 greffes ont été réalisées chez le rat et la souris, dont plus de 300 ont été faites à partir de matériel congelé. Nous examinerons successivement les autogreffes de peau normale, non traitée, puis les autogreffes de peau soumise à l'action des basses températures.

I. LES AUTOGREFFES DE PEAU NORMALE

Les techniques que nous avons utilisées dans le cas des autogreffes donnent un pourcentage élevé de résultats positifs.

<i>Nombre d'animaux</i>	<i>Animal</i>	<i>Type de greffe</i>	<i>Greffon</i>	<i>% de résultats positifs</i>
30	rat	Autogreffe	Peau totale	60
	(3-6 mois)	libre ajustée		
90	rat	Autogreffe	Dermo	
		libre ajustée	épidermique	
			mince	90
200	Souris	Autogreffe	Dermo	
	(adultes)	libre ajustée	épidermique	
			mince	95

Seules les greffes de peau totale, dont la revascularisation est difficile, ne semblent pas fournir des résultats très constants. Aussi, nous sommes-nous principalement intéressés aux greffons dermo-épidermiques minces.

Avant d'étudier de façon plus approfondie le comportement des greffons autogènes, il est bon de rappeler de quelle manière évolue une plaie cutanée ouverte, en l'absence de toute greffe. Nous envisagerons un cas intermédiaire où la perte de substance est relativement large et intéresse tout ou partie du derme, voire même une portion de l'hypoderme. Cela correspond aux conditions de réalisation du *lit* de greffe, tel que nous l'avons décrit précédemment.

Dans le cas d'une plaie cutanée étendue et relativement profonde, la cicatrisation est assez lente. Elle ne peut d'ailleurs se faire qu'après constitution d'un *tissu de granulation* (Francillon et Truchet [46]), provenant d'une prolifération conjonctivo-vasculaire accompagnée de différenciation histogène. Un réseau vasculaire de néoformation se constitue à la surface de la zone de réparation, à partir des vaisseaux sous-cutanés qui s'élèvent de la profondeur et se recourbent en crosse à leur extrémité. Le développement conjonctif se fait parallèlement aux axes sanguins, donc perpendiculairement à la surface cruentée.

L'ensemble recouvre la plaie et forme un bourgeon charnu. Cette évolution de-

viendrait, semble-t-il, envahissante et extensive si un processus d'épidermisation ne freinait pas la prolifération cellulaire en recouvrant le tissu de granulation d'un vernis épithélial mince. L'avancée du front épidermique se fait, le plus souvent, à partir des lèvres de la plaie en direction du centre de la zone délabrée. En même temps que la nappe épithéliale progresse, il se produit une lente rétractation du tissu conjonctivo-fibreux à l'intérieur du tissu de granulation et cela aboutit à une cicatrice allongée, d'aspect très caractéristique en bâtonnet bifurqué aux deux extrémités. Cette cicatrice évolue ensuite lentement et subit un remaniement fibreux suivi de l'apparition de fibres élastiques. Dans certains cas, la prolifération conjonctive est telle que les formations collagènes s'étendent en dehors des limites de la plaie. Il se crée ainsi une sorte d'excroissance conjonctive qui constitue la *chéloïde*.

Lorsque la perte de substance a été comblée par l'apport d'un greffon autogène, l'évolution de la blessure est totalement différente.

Si l'on considère l'aspect macroscopique de la zone de greffe, on constate qu'au bout de 24 heures, la face interne du transplant est déjà adhérente. A la fin de la première semaine, il est totalement soudé par sa partie périphérique et ses relations avec les tissus voisins sont très solides (figure 37).



Figure 37. Aspect de la zone de greffe sur la partie dorsale d'un rat adulte, trois semaines après l'opération. Région antérieure : peau congelée et dégelée sans traitement préalable. Le greffon, devenu corné, est en train de tomber. Région postérieure : peau congelée et dégelée après imprégnation préalable dans du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol. Le greffon est bien adhérent et les poils commencent à pousser.

La peau est souple et rasée sur toute son étendue. Dans les semaines qui suivent, la cicatrisation se poursuit activement et, un mois après environ pour le rat, ou deux à trois semaines pour la souris, les poils ont repoussé. Il devient alors difficile de voir la partie greffée.

Du point de vue histologique, il semble que la fixation du greffon, dans les premières heures qui suivent la greffe, soit due à des réactions de précipitations de mucopolysaccharides (Bassett [4]) et à la constitution d'un réseau de fibrine. Puis des vaisseaux pénètrent à l'intérieur du tissu transplanté, et s'anastomosent avec les espaces vasculaires du greffon. Ce phénomène a été étudié par Taylor et Lehrfeld [206], chez le rat, grâce à la capillaroscopie. Nous avons trouvé des résultats identiques en utilisant la même technique. Après l'opération, les capillaires du greffon contiennent peu de globules et l'aspect général est pâle.

Le lendemain de la greffe, de nombreux vaisseaux apparaissent pleins de sang à l'état statique, mais non coagulé. Il s'agit donc là d'un remplissage secondaire de vaisseaux anciens par l'intermédiaire de la zone d'adhérence. Au deuxième jour, tous les vaisseaux sont pleins de sang et quelque peu distendus. Des anastomoses vasculaires très fines, mais très solides, se sont donc réalisées entre le greffon et l'hôte. La circulation apparaît au cours des troisième et quatrième jours, ce qui indique qu'un plus grand nombre d'anastomoses se sont produites. Dans le cas de la peau totale, le rétablissement de la circulation capillaire est beaucoup plus lente, ce qui semble bien prouver que c'est principalement par le *lit* de greffe que se fait la revascularisation du greffon, plus que par les lèvres de la plaie. Enfin, lorsque la soudure périphérique achève de se constituer au huitième jour, la circulation est devenue normale dans le transplant. La greffe est positive.

Comment expliquer alors les cas d'insuccès ? Il semble, à notre avis, qu'il s'agisse surtout d'échecs par suite de phénomènes mécaniques, en particulier consécutivement à une mauvaise contention du greffon. Les déplacements constants de la peau empêchent la revascularisation, et le greffon ne tarde pas à se dessécher et finit par tomber.

2. LES AUTOGREFFES DE PEAU CONGELÉE A TRÈS BASSE TEMPÉRATURE PUIS DÉGELÉE

Comme nous l'avons indiqué au début de ce chapitre, nous avons utilisé pour la peau, des méthodes identiques à celles qui ont été exposées précédemment. Les diverses expériences nous ont d'ailleurs conduit à des conclusions semblables à celles de la culture *in vitro*. En particulier, une imprégnation préalable par du glycérol ainsi qu'un dégel rapide se sont avérés nécessaires.

De nombreuses expériences d'orientation nous ayant permis de préciser les conditions optima de travail, nous nous bornerons à exposer les résultats

que nous avons obtenus en congelant rapidement dans l'azote liquide, des greffons dermo-épidermiques minces, imprégnés par 20 à 30 % de glycérol, puis greffés en autogreffes orthotopiques après dégel rapide.

Le tableau suivant résume les résultats expérimentaux.

<i>Nombre d'animaux</i>	<i>Animal</i>	<i>Type de greffe</i>	<i>Greffon</i>	<i>% de résultats positifs</i>
30	rat (3-6 mois)	Autogreffe libre ajustée	Peau totale	10
100	rat	Autogreffe libre ajustée	Dermo épidermique mince	35
150	Souris (adultes)	Autogreffe libre ajustée	Dermo épidermique mince	70

Nous retrouvons ici ce que nous avons constaté dans le cas des autogreffes normales, c'est-à-dire, les mauvais résultats donnés par la greffe de peau totale. Quant à la forte différence de pourcentage entre la souris et le rat, dans le cas des greffons dermo-épidermiques minces, nous croyons devoir l'attribuer à des difficultés d'ordre mécanique. Presque tous les cas négatifs en effet, correspondent à des animaux dont le pansement a été déchiré ou s'est déplacé. Le plâtre de contention, utilisé chez les souris, assure au contraire un maintien parfait du greffon.

Du point de vue macroscopique, comme à l'échelle histologique, l'évolution de la greffe de peau congelée se rapproche beaucoup de celle de la peau normale. Toutefois, il faut noter un certain nombre de différences :

Il existe au départ un *temps de latence* beaucoup plus long avant qu'un ancrage solide du greffon soit réalisé. Il faut en effet compter près de 15 jours pour que le transplant soit solidement soudé aux lèvres de la plaie, et ceci explique pourquoi les échecs dus aux mouvements du pansement sont plus nombreux.

Il se produit une desquamation de la couche cornée, ainsi que des assises cornées et d'une portion du corps muqueux de Malpighi. L'ensemble forme une pellicule dure qui tombe en 10 jours environ.

La réapparition des poils est plus lente et ne se fait guère avant un mois et demi pour le rat, et 4 à 5 semaines pour la souris.

Malgré cela, la prise de la greffe est très bonne et la revascularisation du greffon s'effectue dans d'excellentes conditions. Le tissu greffé conserve sa structure et son intégrité et, plus d'un an après, on peut encore le voir intact au

centre de la zone opératoire, comme le montrent des coupes histologiques pratiquées chez le rat (figure 38), et la souris (figure 39).

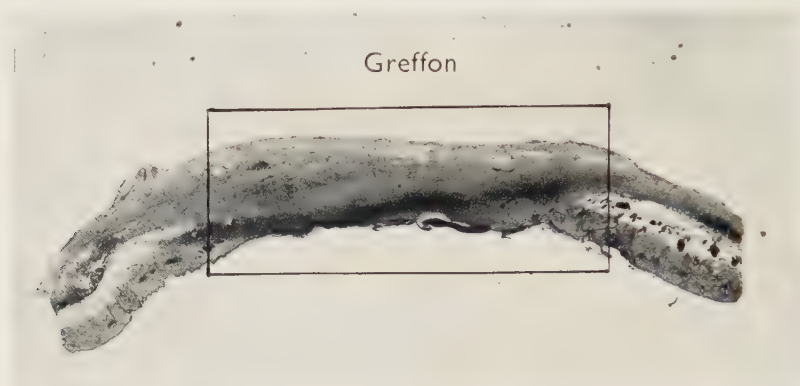


Figure 38. Coupe transversale de la zone de greffe un an après l'opération. Le greffon visible au centre est parfaitement conservé. Il avait subi une congélation lente dans l'azote liquide, suivie de dégel rapide après imprégnation préalable par du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol. Rat âgé de 6 mois au moment de la greffe. Greffon épais (Bouin, Trichromique de Masson $\times 6$).



Figure 39. Coupe transversale de la zone de greffe trois mois après l'opération. Le greffon, plus clair, est visible au centre et apparaît parfaitement conservé. Il avait subi une congélation rapide dans l'azote liquide suivie de dégel rapide après imprégnation préalable par du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol. Souris adulte. Greffon dermo-épidermique (Bouin, Trichromique de Masson $\times 14$).

Si l'on envisage l'ensemble des expériences de greffes, on peut ainsi affirmer que la peau est susceptible de supporter, après un traitement protecteur, la température de -196°C . sans altérations, et qu'elle semble conserver par la suite l'essentiel de ses propriétés physiologiques. Malgré des différences importantes de matériel et de méthodes, nos résultats concordent donc avec ceux qui ont été obtenus par Skoog [186], Keeley, Gomez et Brown [79], Taylor, Gerstner et Converse [205], Billingham et Medawar [14].

III. Le problème des homogreffes.

Basses températures et pouvoir antigénique

Ainsi que nous l'avions signalé au début de cette étude, nous n'avons abordé le problème des homogreffes que dans la mesure où il se rattachait aux effets généraux du froid sur les tissus.

La question des homogreffes présente en effet certainement un très grand intérêt, tant au point de vue théorique que pratique, et l'étude des conditions de survie de greffes homologues a fait l'objet de très nombreux travaux. Nous ne ferons que les évoquer.

Depuis fort longtemps déjà, les chirurgiens savent parfaitement qu'un greffon homologue frais et vivant est en général voué à l'expulsion au bout d'un temps plus ou moins long. Ceci est spécialement vrai pour la peau, qui est connue pour ses très fortes réactions antigéniques. On signale cependant quelques très rares exemples de réussites. Ils sont limités toutefois à des cas de parenté, directe ou très proche, entre l'individu donneur et celui qui reçoit le greffon. Dans l'ensemble, les résultats sont négatifs. Il serait pourtant du plus haut intérêt, en médecine traumatologique, de pouvoir disposer (Rey [169]) de greffons homologues de peau conservée à l'état vivant, et qui puissent être utilisés cliniquement dans des cas d'urgence, avec un succès égal à celui des greffons d'os (Hyatt [75], Herbert [65]), ou de cornées (Peyraud [64], Hénaff [64]). C'est pourquoi on a cherché à établir des techniques particulières permettant de diminuer, voire même de supprimer la réaction d'expulsion.

Les premières manifestations réactives se situent au niveau de la vascularisation du greffon qui ne tarde pas à présenter une stase sanguine générale, suivie d'éclatements capillaires (Taylor et Lehrfeld [206]). La réaction est encore plus violente s'il s'agit d'une deuxième ou une troisième tentative d'homogreffes (Lehrfeld, Taylor et Converse [87]). On a pu attribuer ce phénomène à une action toxique spécifique exercée par le sang de l'hôte sur les cellules du donneur (Billingham et Sparrow [15]).

On a pensé également que l'échec des homogreffes cutanées pouvait être dû à une réaction d'immunité acquise dont le support responsable serait les protéines de la peau (Badinand et coll. [3]).

Quoi qu'il en soit, les facteurs qui peuvent intervenir dans un semblable processus sont très nombreux. On a pu, par exemple, constater l'influence de certains états physiologiques sur l'intensité de la réaction d'immunité. La gestation favorise la prise des homogreffes, dont la durée de survie est presque doublée (Heslop et coll. [66]) ; le sexe peut intervenir, ainsi la castration exerce-t-elle un effet favorable, qu'elle soit associée ou non avec un traitement pharma-

cologique (Schafer [178, 179]). Des ablations autres que celles des glandes sexuelles, et en particulier la splénectomie (Werder et Hardin [214]), ont réussi à prolonger la vie du greffon.

Toutefois, c'est surtout vers trois méthodes principales que l'on s'est tourné pour chercher une solution à la survie des homogreffes.

L'irradiation totale du corps par les Rayons X (Braun [19], Hardin et Werder [60]) a donné de bons résultats malgré les risques d'effets secondaires. Une deuxième méthode a fait appel au pouvoir anti-inflammatoire considérable de certains stéroïdes. La cortisone (Seothorne [182]) et l'ACTH (Medawar et Sparrow [113]) se sont montrés efficaces sans que les résultats deviennent définitifs. Seule la troisième méthode a pu donner des résultats positifs reproductibles et durables. Il s'agit alors de modifier le milieu intérieur de l'hôte par des injections préalables de cellules vivantes provenant du donneur (Billingham et Sparrow [16], Castermans [30]). Pour obtenir un pourcentage élevé de succès les injections doivent avoir lieu dans les premières heures qui suivent la naissance, et il n'est pas difficile de concevoir combien cet handicap est sérieux. Il serait en effet préférable, à tous les points de vue, de pouvoir modifier le greffon plutôt que de préparer l'hôte.

C'est précisément là où interviennent les basses températures. On peut penser que l'exposition prolongée de tissus vivants à un froid très intense, si elle ne modifie pas de façon sensible le comportement ultérieur du tissu, peut, néanmoins, provoquer de très faibles altérations des protéines structurales, ayant pour résultat d'abaisser leur antigénicité. Cette hypothèse a semblé trouver confirmation dans divers travaux récents (Hufnagel [72], Morgan [121], Henaff [64]) et nous avons essayé d'en effectuer une brève vérification expérimentale.

Des rats de 6 mois ont été choisis au hasard dans un lot homogène et la peau a été prélevée puis congelée comme nous l'avons décrit plus haut, et finalement greffée en homogreffe. Nous avons constaté sur une trentaine d'animaux que la congélation préalable permettait d'accroître le temps de survie de la greffe. En effet, la moyenne d'expulsion se situe alors vers 21 jours contre 12 jours pour des greffons non imprégnés. Il semble donc que cette méthode puisse être employée, mais de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour préciser ses conditions précises d'application.

Conclusion

A la suite de ces expériences d'autogreffes de peau, il semble donc que le dernier doute soit levé sur les possibilités de survie d'un tissu animal après exposition aux basses températures. La méthode de greffe *in vivo* apporte en effet à la

technique *in vitro* les résultats d'expériences de longue durée et l'ensemble des recherches ainsi réalisées prouve qu'un tissu animal, convenablement imprégné, congelé, stocké et dégelé, conserve des éléments cellulaires vivants tout en gardant une fonction physiologique intacte. L'absence de phénomènes d'évolution tardive semble en plus, garantir que le séjour à basse température n'apporte aucune modification importante, susceptible de provoquer une altération, même lointaine, du fonctionnement physiologique. Parallèlement à ces constatations, il faut souligner de manière très nette toute l'importance qu'il convient d'attribuer au glycérol dans les phénomènes de protection contre le froid. C'est en effet grâce à sa présence au sein des tissus, que les actions les plus nocives des basses températures peuvent être écartées.

Quel rôle doit-on attribuer au glycérol dans ces phénomènes de protection, quelle est son action à l'échelle cellulaire ? Il nous faut pour cela, revenir de l'organe complexe jusqu'à la cellule animale elle-même, et essayer de suivre au niveau même des éléments constitutifs des tissus, les phénomènes de congélation et de dégel. Peut-être, alors, pourrions-nous comprendre et tenter d'expliquer comment le glycérol peut protéger un tissu vivant contre les effets mortels des très basses températures.

Observation microscopique des processus de congélation et de dégel à l'échelle cellulaire

Au cours des diverses recherches que nous venons d'exposer, nous avons essayé de connaître quels étaient les effets principaux des basses températures sur les tissus et organes animaux. Nous avons pu analyser séparément les processus de congélation et de dégel et nous avons évoqué les problèmes liés à l'évolution du matériel congelé, lors du séjour à basse température. Cependant, nous sommes encore très loin de savoir comment réagit au froid l'élément constitutif du tissu, la cellule animale elle-même. Il est toujours difficile, en effet, d'affirmer que tel ou tel processus d'altération au cours de l'exposition à basse température est dû à la congélation ou bien au dégel. Seul l'examen microscopique direct des tissus pendant la période de refroidissement et de dégel, peut permettre de suivre les processus d'altération dans leur intégrité et apporter ainsi la sécurité d'interprétation qu'aucune méthode indirecte n'est susceptible de garantir.

Pour cela, il faut pouvoir observer les tissus à l'aide de tous les procédés optiques classiques, tout en les soumettant à l'action du froid, et la solution de ce problème est avant tout d'ordre instrumental.

Pendant longtemps les auteurs ont tourné la difficulté en opérant en chambre froide (Chambers et Hale [31]). Il est facile de concevoir combien cette méthode est malaisée et combien son champ d'applications est étroit, aussi a-t-on cherché à construire des instruments permettant d'effectuer des observations microscopiques à basse température par le seul refroidissement du spécimen. Dans l'ensemble, les appareils qui ont été réalisés dans ce but n'assurent qu'un refroidissement très lent, difficilement réglable et ne dépassant pas la température de -120°C . Leurs principes diffèrent sensiblement. Hocart et Monier [69] décrivent en 1949 un équipement d'observation aux basses températures adapté à un microscope métallographique polarisant. L'appareil fonc-

tionne par ébullition d'azote liquide et il faut 30 minutes pour atteindre -120°C .

En 1951, Smith, Polge et Smiles [194] réalisent une platine réfrigérante selon un procédé complètement différent. L'objet est porté par une lame de « Perspex » refroidie par conduction le long de deux rubans de cuivre plongés dans de l'azote liquide. Cet appareil se prête bien à l'observation microscopique d'objets transparents, mais la température est difficile à régler. Il est relativement aisé d'atteindre -45°C , mais la limite thermique semble être de -79°C . Harmer [61] en 1953, apporte un certain nombre de perfectionnements et son dispositif permet d'obtenir -90°C en quelques minutes, et exceptionnellement -120°C . Le dégel s'obtient par chauffage électrique en 4 minutes environ.

Malgré leur grande facilité de manipulation, ces divers instruments présentent en commun le même inconvénient qui est de ne donner que des refroidissements et dégels lents et difficilement réglables. Cela représente un sérieux handicap car, comme nous l'avons vu, il serait intéressant de pouvoir étudier de nombreux phénomènes et en particulier le dégel, à des vitesses beaucoup plus élevées.

L'appareil décrit par A. C. Taylor [205] en 1956, montre une grande amélioration sur les dispositifs antérieurs. Il assure en effet des vitesses de congélation élevées grâce à une circulation d'isopentane froid. Malheureusement l'observation est de courte durée et il est difficile de modifier la température de façon continue. C'est pourquoi, afin de réaliser des recherches très variées, nous avons été amenés à construire un dispositif nouveau qui permet de refroidir lentement ou brutalement des préparations minces et transparentes, de les observer une fois congelées, pendant tout le temps nécessaire, et tout en maintenant la température constante, et enfin d'opérer le dégel à la vitesse désirée. (Rey [166]).

I. Dispositif nouveau pour l'examen microscopique aux basses températures.

Construction, fonctionnement et domaine d'utilisation

L'appareil que nous avons construit diffère totalement de ceux que nous venons de décrire par suite de ses très nombreuses adaptations possibles. C'est pourquoi nous avons cru devoir en donner une description détaillée, étudier son fonctionnement de façon précise et envisager ses diverses possibilités d'applications.

Il a été réalisé à l'Ecole Normale Supérieure au Laboratoire de Zoologie-Physiologie et la figure 40 en donne une vue d'ensemble. La construction de cet instrument a été conçue de telle sorte qu'il soit possible de faire deux types de montages différents à l'aide d'une seule installation. Pour faciliter la compréhension du schéma de principe, nous envisagerons tout d'abord le montage le plus complexe, celui qui est utilisé pour les réfrigérations rapides.

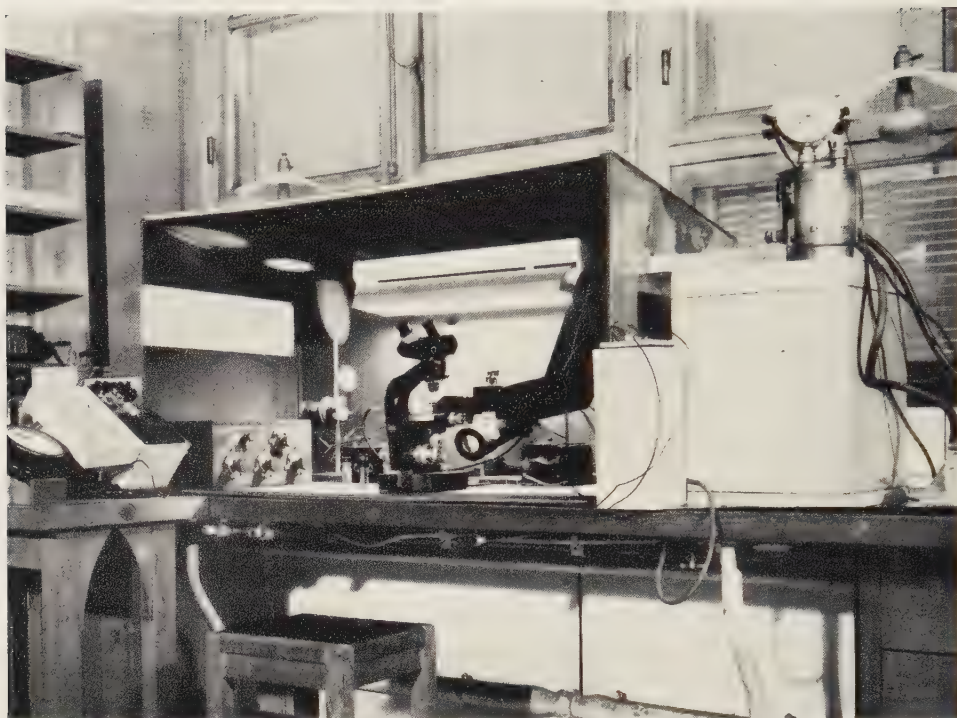


Figure 40. Vue générale du dispositif permettant l'examen microscopique aux basses températures.

Au cours de la description qui va suivre, nous négligerons de parler du microscope lui-même. Il s'agit en effet, d'un microscope binoculaire standard, pourvu d'une *tête* photographique et équipé soit d'un dispositif polarisant, soit d'un système de contraste de phase à longue focale. Une lampe ponctuelle associée à des filtres interférentiels colorés et anticaloriques, permet l'observation et la photographie. Dans certains cas et pour les phénomènes transitoires, nous avons utilisé des lampes éclair au magnésium ou un *flash* électronique.

1. RÉFRIGÉRATION RAPIDE (figures 41 et 42)

A. Principe

Le principe de fonctionnement consiste à refroidir le spécimen contenu dans une cellule d'observation (Cell) à l'aide d'une circulation de liquide (L) entouré d'un bain réfrigérant (B R).

B. Description et construction

L'objet à examiner est porté par la glace supérieure (G_1) d'une cellule d'examen métallique (Cell) fermée à sa partie inférieure par une deuxième glace optique

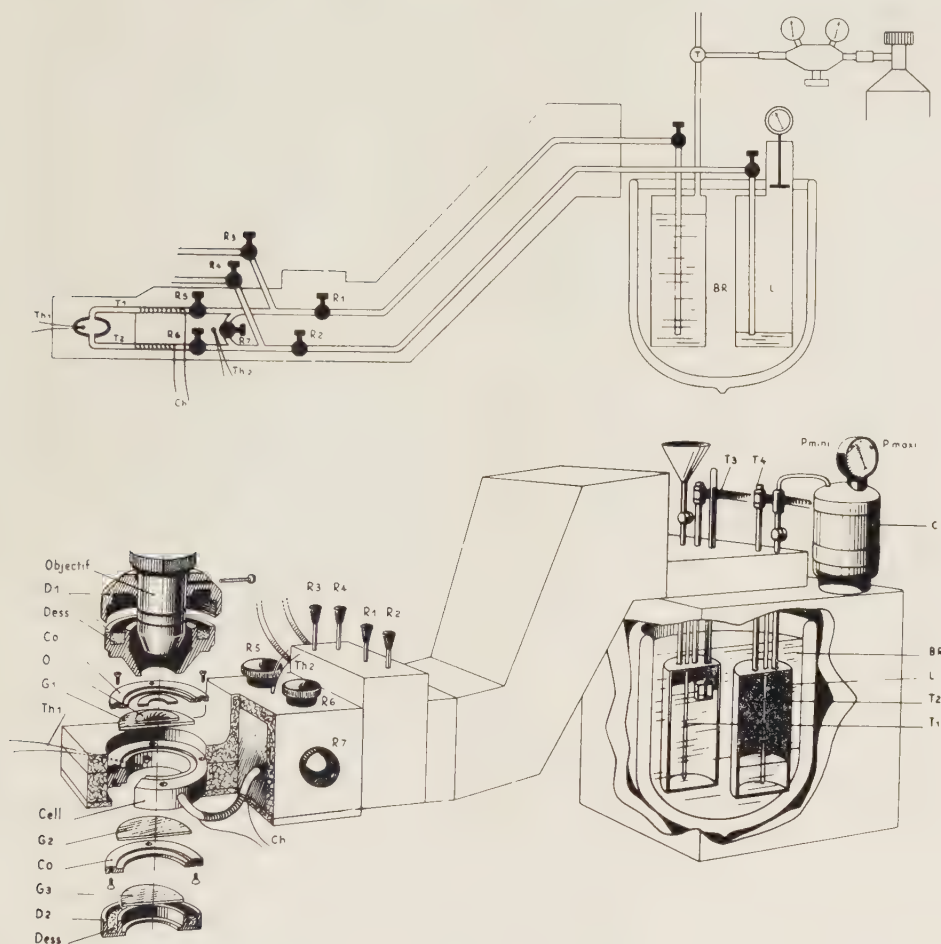


Figure 41. Schéma de principe et plan détaillé du montage utilisé pour les réfrigérations rapides.

T : arrivée de gaz et échappement libre.

L : liquide de circulation.

$R_5 - R_6$: robinets de commande de la cellule d'examen.

R_7 : robinet de commande du court-circuit.

Th_2 : sonde thermo-électrique donnant la température au niveau des canalisations.

Ch : spirale chauffante.

$T_3 - T_4$: arrivée de gaz.

C : réservoir de compensation.

$T_1 - T_2$: canalisations de circulation de liquide.

Les autres légendes sont identiques à celles de la figure 43.

en quartz mince (2/10 mm). Deux enceintes étanches ((D_1) et (D_2)) contenant du desséchant (P_2O_5) et respectivement placées autour de l'objectif et au-dessus du condenseur, empêchent tout givrage au cours de l'observation. L'enceinte supérieure (D_1) appuie sur la préparation (0) par l'intermédiaire d'un joint annulaire élastique et étanche. Une glace optique ferme l'enceinte inférieure (D_2) à sa partie basale. La circulation de liquide réfrigérant se fait dans la cellule grâce à deux canalisations (T_1) et (T_2) issues d'un bloc métallique voisin porteur de trois robinets. Deux d'entre eux ((R_5) et (R_6)) contrôlent le débit de liquide dans la cellule, tandis que le troisième (R_7) peut ouvrir ou fermer un passage mettant la cellule hors-circuit. Le bloc métallique est lui-même relié à une pièce intermédiaire, portant quatre robinets de commande, permettant, d'une part de contrôler le débit général du liquide de circulation (R_1) et (R_2), et, d'autre part d'effectuer un branchement secondaire sur deux autres canalisations (R_3 et R_4) réunies à un dispositif de réchauffement.

La pièce intermédiaire reçoit les deux canalisations (T_1 et T_2) amenant le liquide de refroidissement. Ce dernier est contenu dans deux bouteilles identiques (L) plongées dans un vase Dewar rempli du mélange réfrigérant (B R). L'une des cuves peut être mise en relation soit avec une bouteille de gaz comprimé, soit avec l'atmosphère, grâce à un système de soupapes commandées électriquement et schématisées par un robinet à double voie (T_1 et T_3). L'autre cuve est réunie à un réservoir de compensation C porteur d'un manomètre à contact. Elle peut également être branchée sur le système de soupapes. Un *voltigeur*, visible de l'extérieur et porté par un flotteur, permet de connaître le niveau de liquide dans la première cuve.

L'ensemble de l'installation est soigneusement calorifugé par un coffrage en Klegecell (résine synthétique de Kléber-Colombes, France). Deux thermocouples Th_1 et Th_2 , reliés à un enregistreur indiquent les températures de la cellule au niveau du spécimen d'une part, et du bloc métallique portant les robinets de contrôle de la circulation d'autre part.

C. Fonctionnement

Au départ, le liquide réfrigérant est contenu dans la première cuve où il a été versé par un entonnoir extérieur. La cuve est alors mise sous pression grâce à la bouteille de gaz comprimé. Les robinets R_1 , R_2 et R_7 sont ouverts, tandis que R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , restent fermés. Le liquide circule alors dans les canalisations et dans le bloc métallique par l'intermédiaire du court-circuit, puis s'accumule dans la deuxième cuve. Au fur et à mesure que le niveau monte dans la deuxième cuve, la pression s'élève dans le récipient de compensation et l'aiguille du manomètre à contact atteint la pression maxima (P. maxi.) lorsque la cuve est presque pleine et qu'il ne reste plus que quelques centimètres cubes de liquide dans la

cuve n° 1. Le manomètre commande alors les soupapes électriques et la cuve n° 1 est mise en décompression sur l'atmosphère tandis que l'arrivée de gaz est coupée. Le liquide circule en sens inverse jusqu'à ce que la première cuve soit presque remplie. L'aiguille du manomètre à contact atteint alors sa position minima (P. mini.) et un relai commandant les soupapes électriques effectue la manœuvre inverse en coupant la communication sur l'atmosphère et en rétablissant la pression de gaz, et un deuxième cycle se réalise.

Au fur et à mesure des circulations successives, l'appareil se refroidit progressivement. Pendant ce temps, une spirale chauffante (Ch) maintient la température de la cellule d'examen constante et empêche la progression du froid le long des conduites. Lorsque l'ensemble des canalisations et du bloc métallique est parfaitement refroidi, on coupe le chauffage puis on ferme le robinet R_7 , et on ouvre R_6 et R_5 . Le liquide circule alors dans la cellule où le refroidissement est instantané par suite de sa très faible inertie thermique.

D. Utilisation

Grâce au système pneumatique de circulation, tous les problèmes mécaniques de graissage et d'étanchéité de pistons, ou de corps de pompe, se trouvent évités et, de ce fait l'appareil fonctionne à n'importe quelle température. Selon les températures extrêmes que l'on désire obtenir, on peut utiliser divers liquides de circulation associés à des bains réfrigérants et des gaz de compression différents. Le tableau suivant rassemble les diverses possibilités.

<i>Gamme usuelle de température</i>	<i>Température extrême atteinte</i>	<i>Liquide de circulation</i>	<i>Bain réfrigérant</i>	<i>Gaz de compression</i>
0 — 60°	— 70° C	Alcool	Glace carbonique acétone	Air sec
0 — 100°	— 110° C	Isopentane	Essence A refroidie par un piège à azote liquide	Air sec
— 60° — 170°C	— 180° C	Propane liquide	Azote liquide	Hydrogène sec

Des températures aussi basses que — 180° C sont donc réalisables avec cet appareillage lorsque l'on utilise propane liquide et azote liquide. L'hydrogène doit être très sec pour éviter toute condensation interne qui produirait un bouchon de glace et l'arrêt de la circulation. Pour cela, il traverse une colonne de desséchant (P_2O_5) suivie par un piège à azote liquide.

Avant d'étudier la réfrigération lente et dans le but de fixer les idées sur les



Figure 42. Montage utilisé pour les réfrigérations rapides. L'alimentation électrique de la spirale chauffante est visible au premier plan. Un miroir permet d'apercevoir le robinet latéral de commande du court-circuit.

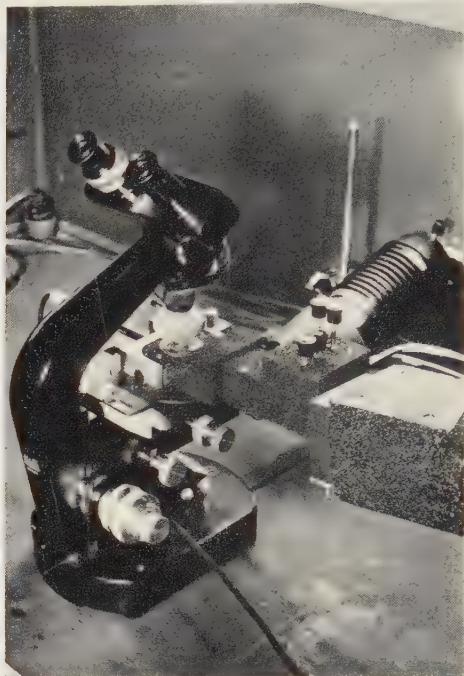


Figure 44. Montage utilisé pour les réfrigérations lentes. La chambre de dessiccation (D_1), entourant l'objectif, est bien visible ainsi que le joint annulaire étanche et souple par lequel elle appuie sur la préparation. Au premier plan, on peut voir le départ de la thermo sonde n° 1. Noter les canalisations de réchauffement en arrière du bloc métallique portant les quatre robinets R_1, R_2, R_3, R_4 .

conditions de fonctionnement, nous donnerons ci-dessous, quelques précisions numériques relatives à l'instrument.

Capacité d'une cuve	260 cm ³
Charge en propane liquide	240 cm ³
Circulation moyenne par minute	1 200 cm ³
Volume de la cellule d'examen	1 cm ³
Pression maxima d'hydrogène	0,600 kg
minima	0,200 kg
Charge en azote liquide	1 400 cm ³
Puissance de la résistance chauffante	15 W

Comme nous l'avons dit précédemment, le même appareil permet également d'effectuer des réfrigérations lentes. Le montage est alors beaucoup plus simple, et nous allons le décrire brièvement.

2. RÉFRIGÉRATION LENTE (figures 43 et 44)

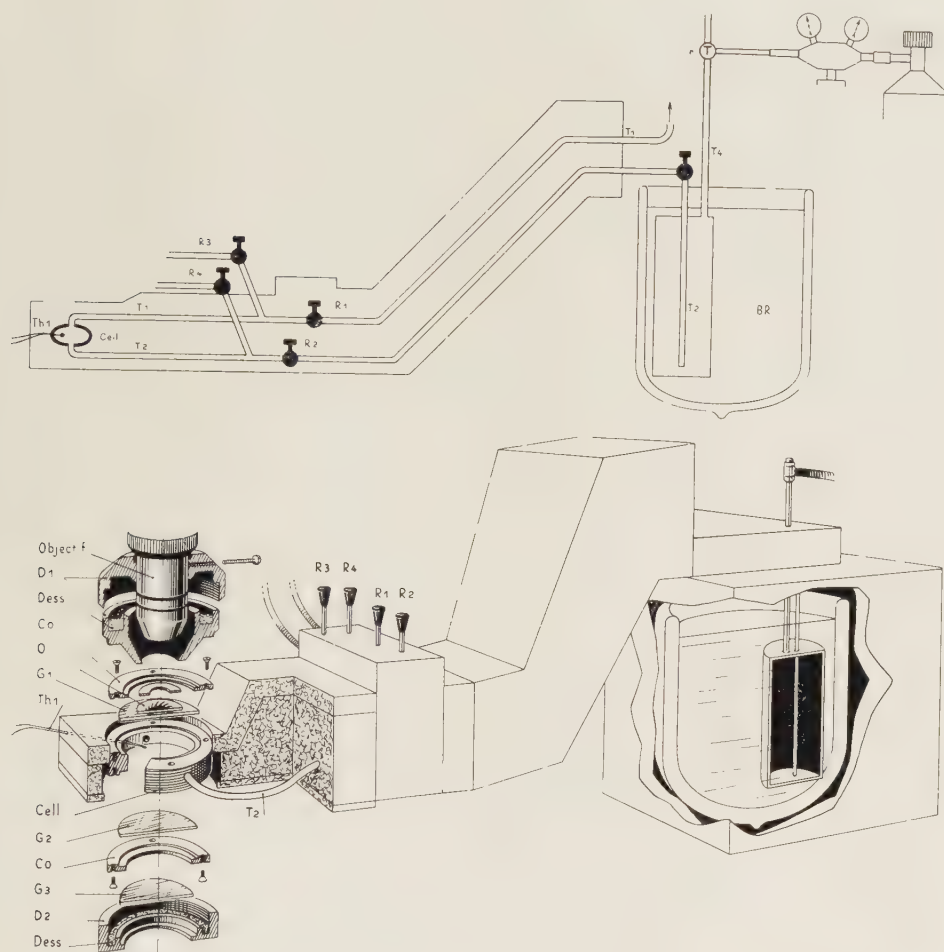


Figure 43. Schéma de principe et plan détaillé du montage utilisé pour les réfrigérations lentes :

BR : bain réfrigérant.

T (r), T₄ : arrivée de gaz.T₂ : canalisation de départ du gaz froid.T₁ : canalisation d'évacuation du gaz.R₁ — R₂ : robinets de commande d'échappement et d'admission de gaz froid.

Cell. : cellule d'examen.

Th₁ : sonde thermo-électrique donnant la température au niveau de la préparation.R₃ — R₄ : robinets de commande du circuit de réchauffement.D₁ — D₂ : chambres hermétiques de dessiccation.

Dess. : desséchant chimique.

CO : couvercles métalliques fermant la cellule d'examen et maintenant les glaces de quartz.

O : préparation examinée.

G₁ — G₂ — G₃ : glaces de quartz.

A. Principe

Le spécimen est refroidi par une circulation de gaz froid.

B. Description et construction

L'objet est également porté par la glace supérieure de la cellule d'examen. Celle-ci est, toutefois, plus simple. En effet, un pré-refroidissement des conduites n'étant plus nécessaire, le bloc métallique portant les robinets de contrôle est supprimé, et la cellule directement reliée à la pièce intermédiaire.

Une seule cuve est utilisée : elle reçoit directement le gaz de la bouteille qui s'échappe à la sortie de la cellule d'examen dans une conduite d'évacuation. On règle aisément la vitesse de refroidissement en agissant sur la pression de charge du gaz ainsi que sur le débit. Tous les gradients sont réalisables depuis quelques degrés par heure, jusqu'à plusieurs dizaines de degrés par minute. Le tableau suivant groupe les principales possibilités d'utilisation.

<i>Gamme de températures</i>	<i>Température extrême</i>	<i>Bain réfrigérant</i>	<i>Gaz utilisé</i>
0 — 40°	— 50° C	Glace carbonique Acétone	Air sec
0 — 80°	— 100° C	Azote liquide	Hydrogène sec

En-dessous de — 100° C, il est nécessaire de poursuivre la réfrigération par une circulation de propane liquide. Ceci est très facile si, au départ, on rassemble le propane dans la cuve n° 1 et que l'on utilise la cuve n° 2 pour refroidir l'hydrogène. Il est alors facile de passer d'un montage à l'autre en moins de 20 secondes.

3. SYSTÈMES DE DÉGEL

Divers dispositifs peuvent être utilisés pour réchauffer la préparation et nous les exposerons brièvement. Dans tous les cas, les robinets R_1 et R_2 sont fermés.

A. Dégel rapide

Lorsque la température du spécimen s'est élevée au-dessus de — 160° C, il est possible de réaliser un dégel rapide en envoyant par les tubulures R_3 et R_4 , un courant d'isopentane chaud, provenant d'un thermostat pourvu d'une pompe de circulation. Le dégel est alors instantané.

B. Dégel lent

Pour réchauffer lentement l'objet examiné, on fait circuler de l'hydrogène pris à la température ordinaire, ou préalablement réchauffé. La pression de charge et le débit règlent la vitesse de réchauffement.

C. Réchauffement rapide à température contrôlée.

Un cas un peu particulier est celui du réchauffement à une température donnée, inférieure à 0° C. Cela s'obtient aisément en faisant circuler dans la cellule d'examen, de l'isopentane porté à la température voulue.

II. Les processus de congélation et de dégel dans les cellules vivantes

Le dispositif que nous venons de décrire nous a permis de suivre les diverses phases du refroidissement et du réchauffement des tissus animaux.

I. MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL

Pour faciliter l'observation, il a été nécessaire d'opérer sur des préparations de faible épaisseur. C'est pourquoi nous avons principalement observé des cellules isolées appartenant à la souche L d'Earle [177], et cultivées en milieu liquide.

Technique

Une suspension cellulaire est préparée à partir d'un flacon de culture standard dérivée de la culture-souche, provenant de Bethesda, et que nous entretenons au Laboratoire. Une goutte de cette suspension réalisée dans le milieu de culture, est déposée sur une lamelle de verre très mince et montée sur une lame de Maximow.

On réalise l'incubation à 37° C en position renversée, pendant 24-48 heures. La préparation est alors soigneusement essorée par la tranche sur un morceau de papier filtre, puis déposée sur la platine réfrigérante. De cette manière, il est possible d'obtenir des préparations très fines, où les cellules sont dans des conditions physiologiques optima, tout en étant parfaitement adhérentes au verre (figure 45, + 20° C). Après mise au point, la chambre de dessiccation D est ajustée sur le joint annulaire, et au bout de 5 à 10 minutes, il est possible de refroidir.

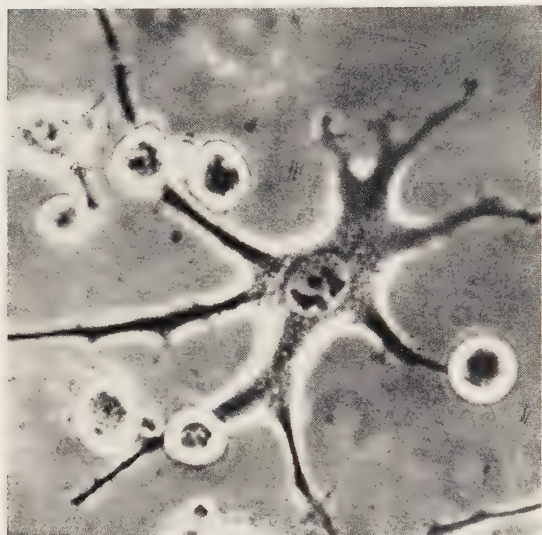
2. OBSERVATIONS

Pour faciliter l'exposé de nos observations, nous avons été obligés de faire parfois appel à des résultats physiques qui seront présentés ultérieurement, mais cela nous a paru indispensable pour assurer une meilleure compréhension des phénomènes de cristallisation. Nous envisagerons successivement, d'une part les cultures normales, et d'autre part celles qui ont été imprégnées par du glycérol.

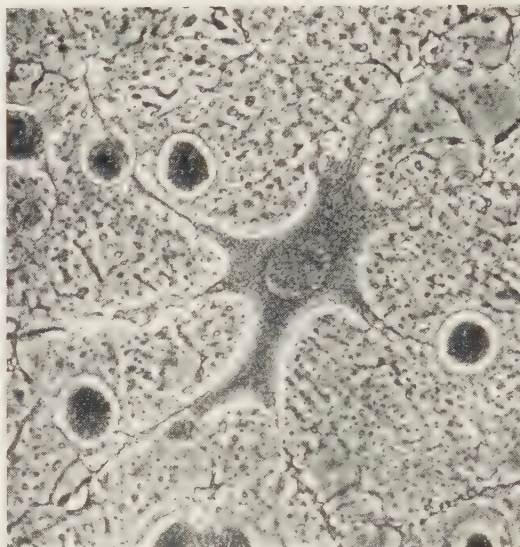
A. Cultures normales

Les phénomènes diffèrent quelque peu selon que la congélation et le dégel sont lents ou rapides.

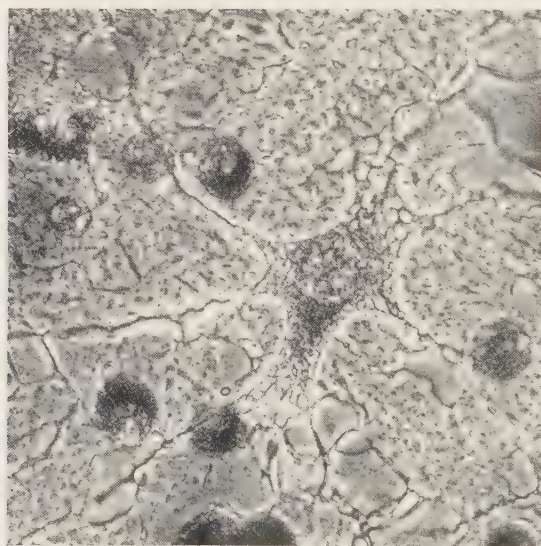
a) *Congélation lente* (figure 45). La première constatation que l'on peut faire est que, si la température est abaissée suffisamment, soit en dessous de -20°C ,



-20°C



-18°C



-153°C

Figure 45. Images successives de la congélation d'une cellule vivante isolée provenant de la souche L d'Earle, cultivée *in vitro* directement sur la surface de verre du porte-préparation (Contraste de phase $\times 560$).

il y a toujours cristallisation. Les liquides biologiques ayant une concentration saline relativement faible, les cristaux qui se forment sont toujours des cristaux de glace, et poussent en général, dans le plan de la préparation. Leur axe optique étant perpendiculaire à leur direction d'étalement, ils apparaissent, le plus souvent, isotropes en lumière polarisée.

La formation des cristaux de glace peut se produire de deux façons différentes : elle peut, premièrement être progressive et débiter dès que la température est de l'ordre de -2°C ou -3°C ; les cristaux qui se développent alors sont aciculaires, à bords très nets, et leur croissance est relativement lente. Il y a peu de centres cristallins, aussi les cristaux sont-ils assez gros. En général, ils ne disloquent pas les cellules mais, souvent, en s'accolant à leur membrane, provoquent, par appel d'eau, une rétraction importante, identique à la cryosynérèse décrite par Becquerel [8]. La cristallisation est en effet initialement extracellulaire. Elle ne devient intracellulaire qu'à une température plus basse et généralement se produit de manière brutale.

Dans un deuxième cas, qui est d'ailleurs plus fréquent, la cristallisation peut se produire à la suite d'un phénomène de surfusion et elle est alors instantanée. Les centres de nucléation sont très nombreux et régulièrement répartis. Les cristaux sont de petite taille (figure 45, -18°C), et ils se forment aussi bien dans les cellules que dans le liquide péricellulaire (figure 45, -18°C). Leur apparition n'entraîne d'ailleurs pas de dislocation de la cellule.

Dans les deux éventualités, les cristaux formés occupent la majeure partie de la préparation. Il demeure toutefois, un liquide interstitiel qui baigne les interfaces cristallines et enveloppe les cellules. Comme nous le verrons plus loin, ce liquide est fortement hypertonique. En effet, l'eau qui se sépare sous la forme de glace, est pure, et les sels se concentrent dans la solution résiduelle. Cette forte teneur saline est responsable de la plus grande partie des altérations causées par le froid. Il semble donc, qu'en première approximation, la mort due au froid ait pour cause principale, un choc osmotique, car les hautes concentrations salines se développent bien avant que des effets mécaniques sérieux ne se produisent.

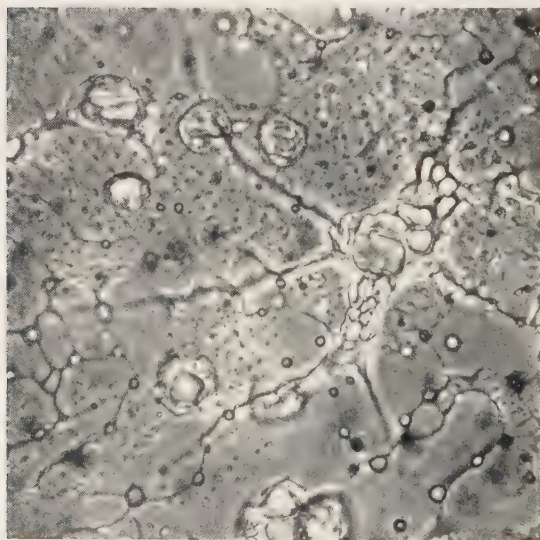
Lorsque l'on poursuit le refroidissement, les cristaux de glace continuent à se développer, quel que soit leur mode de formation. Cette croissance est cependant très faible en-dessous de -20°C , et elle semble s'arrêter totalement entre -30°C et -45°C . On peut alors constater que le liquide résiduel est devenu cristallin. Si la température continue à s'abaisser, on ne note, en général, pas de changements (figure 45, -153°C).

b) Congélation rapide. Lorsque le refroidissement est très brutal, il se produit toujours une cristallisation simultanée des liquides intracellulaires et péricellulaires, comme dans le cas de surfusion. Le nombre de centres cristallins est

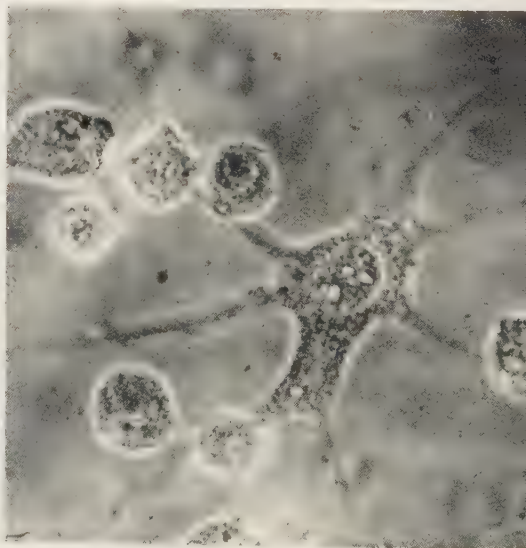
toutefois beaucoup plus élevé, et la texture devient microcristalline. Dans certains cas même, il est pratiquement impossible de voir les cristaux et la préparation apparaît comme figée par le froid. Un léger changement dans la transparence, joint à une augmentation sensible de la diffraction semblent indiquer cependant, que la structure n'est pas amorphe.

c) *Dégel lent.* Après avoir observé pendant un certain temps la préparation à basse température, on peut réchauffer la platine et étudier le dégel. Lorsque le retour vers 0° C se fait de façon progressive, on assiste à une évolution considérable des diverses structures, et elle semble indépendante du type de congélation préalable.

En général, dès la température de -50°C , on peut voir un certain remaniement cristallin. Les divers microcristaux tendent à s'unir en masses plus volumineuses et ceci s'amplifie au fur et à mesure que la température s'élève. Ces gros cristaux ne tardent pas, lorsqu'ils sont intracellulaires, à provoquer des ruptures et des dislocations dans l'architecture très fine du cytoplasme. Pratiquement, vers -20°C , la plus grande partie du contenu cellulaire a pris la forme d'un réseau déshydraté et irrégulier, englobant de gros cristaux de glace (figure 46, -20°C). Vers -20°C également, les solutions hypertoniques qui étaient déjà apparues près de 10 à 15°C plus bas, commencent à envahir les espaces intercristallins. Puis, la température continuant à s'élever, le liquide



— 20°C



5°C

Figure 46. Etude des processus de dégel de la même cellule.

interstitiel s'accroît tandis que les cristaux de glace s'uniformisent, régularisent leurs contours et finissent par fondre. Après fusion totale, la cellule apparaît très modifiée, et plus ou moins disloquée. Les nucléoles ont disparu et les protéines intranucléaires ont précipité. Le cytoplasme est devenu granuleux et les prolongements protoplasmiques sont très souvent rompus. L'ensemble évoque plus un cadavre cellulaire qu'une unité vivante, et, de fait, la cellule est morte.

Le processus de dégel est donc relativement très différent de celui de la congélation. Il montre en effet, ce curieux phénomène de *migratory recrystallization* étudié par Meryman [114] à l'aide du microscope électronique. Ceci souligne le danger des températures intermédiaires.

d) *Dégel rapide*. Les faits que l'on observe au cours d'un dégel rapide sont assez différents quoique leur mécanisme soit identique. Cependant, le réchauffement rapide empêche le phénomène de remaniement des cristaux de glace. Le temps d'action des solutions hypertoniques se trouve également considérablement raccourci, aussi n'est-il pas étonnant de constater, alors, après dégel, que la cellule est beaucoup moins altérée qu'à la suite d'un dégel lent. S'il est même suffisamment rapide, on ne note pratiquement pas de modifications.

L'observation microscopique des cellules normales en cours de refroidissement et de réchauffement apporte donc un certain nombre de précisions intéressantes. L'eau cellulaire cristallise sous forme de glace et la taille des cristaux formés dépend de la vitesse d'évolution du système. Au cours des refroidissements lents, la cristallisation débute par le liquide péricellulaire, ce qui confirme les observations de Chambers et Hale [31]. Des phases liquides hypertoniques subsistent jusque vers -45°C et apparaissent de nouveau au dégel vers -30°C . Au cours des dégels progressifs, il se produit des remaniements importants du matériel cristallin à basse température. Cela souligne les différences très grandes qui existent entre la congélation et le dégel. Dans les cas d'évolution lente, il semble que, par suite des phénomènes de surfusion, les altérations dues à la congélation soient principalement d'ordre osmotique, tandis que celles qui se produisent au cours du dégel sont surtout mécaniques.

Par contre, lorsque les variations thermiques sont rapides, l'évolution normale ne peut pas avoir lieu et les nombreux microcristaux formés au cours de la congélation, fondent sur place lors du dégel, sans avoir pu se développer. Dans tous les cas, enfin, après dégel, les cellules apparaissent plus ou moins lésées.

B. Cultures imprégnées par du glycérol

L'observation des cellules traitées par le glycérol, a permis de mettre en évidence des différences très importantes. Elle est d'ailleurs beaucoup plus difficile car la déshydratation partielle due à la glycérine, provoque une rétraction générale

de la cellule qui tend à s'arrondir, à se décoller de son support, et dont la surface plissée gêne l'étude détaillée. De plus, le glycérol homogénéise le noyau où les nucléoles disparaissent comme l'a constaté Taylor [203]. Ces modifications sont d'ailleurs réversibles et il suffit de baigner à nouveau la cellule dans une solution physiologique pure pour qu'elle reprenne son aspect normal.

a) *Congélation*. Lors de la congélation lente on observe souvent un phénomène de surfusion, qui, dans ce cas, peut être d'assez vaste amplitude (jusque vers -25°C). La rupture de cet équilibre métastable donne un feutrage de cristaux péricellulaires très fins, séparés par des veines liquides. Lorsque la cristallisation est progressive, les cristaux qui se développent, s'accroissent lentement en donnant des flèches arrondies, d'aspect plumeux, qui se réunissent en systèmes complexes. Entre les cristaux, se trouve une solution interstitielle qui baigne également les cellules. Si l'on continue alors à refroidir, les cristaux s'accroissent mais la solution se résorbe très lentement. En effet, en plus de sels originaux, elle contient du glycérol. Il faut abaisser la température très bas, vers -60°C , pour que ce liquide se solidifie en une masse translucide, d'aspect vitreux. Toutefois, par suite du très faible diamètre des veines liquides, l'observation est difficile et la structure exacte de la solution ne peut être déterminée avec certitude.

Quant à la cristallisation intracellulaire, il est vraisemblable qu'elle se produit à basse température (-60°C à -80°C) mais elle est très difficile à observer surtout lorsque la concentration en glycérol est élevée.

La diminution très nette de la vitesse de cristallisation ainsi que la tendance à donner des formes mal définies, qui résultent de l'addition du glycérol, contribuent à ce que les congélations rapides aboutissent à des formes microcristallines, voire même cryptocristallines.

b) *Dégel*. L'un des traits les plus caractéristiques du dégel lent tient peut-être à ce qu'il présente une réplique inversée presque parfaite du processus de congélation. Il convient cependant de faire une exception pour le phénomène de remaniement cristallin qui est également très visible dans le liquide péricellulaire. Mais cela mis à part, le dégel semble débiter à la température à laquelle a fini la cristallisation, et dès -50°C à -60°C , on peut penser que les veines interstitielles contiennent à nouveau du liquide. On ne les voit toutefois s'accroître qu'à une température beaucoup plus élevée (-30°C). L'ensemble du processus présente un aspect progressif, homogène et à tous moments réversible. Après dégel total, et si le réchauffement n'a pas été trop lent, la cellule protégée par une concentration adéquate de glycérol, apparaît intacte et l'élimination du glycérol lui rend motilité et sensibilité. Par opposition au dégel progressif, le dégel rapide, ici encore, a pour effet de supprimer les stades intermédiaires, mais il n'introduit pas de phénomènes nouveaux.

Dans l'ensemble, les expériences que nous avons réalisées complètent celles de Smith et Smiles [195] et de Taylor [205], et elles concordent avec leurs premiers résultats. Nos observations montrent que le glycérol exerce un effet régulateur sur les phénomènes de cristallisation et que, par suite de sa pénétration dans la cellule, il évite les phénomènes de dislocation. Il dilue, de plus, la solution hypertonique et diminue ainsi le choc osmotique. Enfin, il semble repousser la limite ultime de solidification et, de ce fait, il allonge la période d'adaptation de la cellule à son nouveau milieu, mais également recule la température de sécurité.

Conclusion

Les expériences de physiologie nous ont permis de mettre en évidence l'intérêt que présente le glycérol dans la protection des tissus contre le froid. Grâce à la culture de tissus, nous avons pu définir les concentrations de glycérol et préciser les conditions d'exposition aux basses températures compatibles avec le maintien de la vie. Les méthodes de culture d'organes et de greffes de peau nous ont montré ensuite que la survie ainsi obtenue, pouvait être de longue durée et que le comportement des tissus, après refroidissement et dégel, était normal. A la suite des observations microscopiques, nous avons un aperçu du mode d'action du glycérol au cours des processus de congélation et de dégel à l'échelle cellulaire.

Après avoir ainsi analysé le rôle protecteur du glycérol contre les effets des basses températures, il nous faut maintenant essayer de comprendre le mécanisme de cette protection. Diverses thèses ont été proposées dans ce domaine, mais, malgré cela, les idées restent obscures et les interprétations imprécises, aussi, est-ce pourquoi nous avons voulu, dans une deuxième partie de notre travail, chercher, dans la physico-chimie, l'explication des effets nocifs des basses températures ainsi que du rôle protecteur du glycérol.

Les premières étapes du refroidissement.

Formation et propagation des cristaux de glace

La chimie biologique et la physiologie ont montré, depuis fort longtemps déjà, que l'eau tenait une place prépondérante parmi les espèces chimiques contenues dans la matière vivante, dont elle est, d'ailleurs, l'élément le plus abondant (60 % environ dans le corps humain). Les sels minéraux et les substances organiques intra-cellulaires se trouvent donc, par là même, en solution diluée. Il n'est dès lors, pas étonnant de voir se former des cristaux de glace lorsque l'on soumet un tissu à des températures inférieures à 0° C. En effet, au cours de la congélation, le point figuratif du suc cellulaire décrit la « branche de glace » du diagramme thermodynamique, et à aucun moment au cours des premières étapes de ce refroidissement, il n'apparaît de cristaux de sel.

Les phénomènes de congélation et de dégel, dans leur ensemble, sont donc dominés par les propriétés de l'eau à basse température. Inversement, la nature du système physique ainsi que la composition chimique du milieu biologique peuvent influencer sur la forme de la cristallisation et de la fusion de l'eau.

La connaissance exacte de ces divers phénomènes est du plus haut intérêt pour la bonne compréhension de l'action des basses températures sur les tissus. Aussi, avons-nous pensé qu'il était nécessaire d'étudier ce problème de façon précise. Nous l'avons fait tout d'abord, d'un point de vue théorique et il nous a fallu, pour cela, aborder des questions de physique pure. Cela nous a semblé indispensable pour la bonne intelligence des faits expérimentaux. Nous envisagerons donc la cristallisation de l'eau pure et des solutions biologiques complexes. Nous étudierons ensuite, de manière plus approfondie, un état particulier de l'eau tissulaire, l'eau sous-refroidie, et, à cette occasion, nous aborderons sous l'angle expérimental, le problème de la propagation de la cristallisation dans

les milieux biologiques et de ses modifications en fonction de la nature du milieu en particulier, de sa teneur en glycérol.

I. Etude de certains aspects théoriques de la cristallisation de l'eau et des systèmes aqueux

Du point de vue physique, l'eau se caractérise par des propriétés très particulières dont les anomalies ont fait l'objet de nombreuses études. C'est pourquoi, avant d'envisager le comportement des solutions aqueuses, nous nous arrêtons quelques instants sur la cristallisation de l'eau pure.

1. REFROIDISSEMENT ET CRISTALLISATION DE L'EAU

A. *Etat physique de l'eau*

A la suite des recherches de Roentgen, les travaux classiques de Tammann [200], Bernal et Fowler [10] ont permis de se faire, de l'eau liquide, une idée assez précise. Longtemps considérée comme un polyhydrol, c'est-à-dire un polymère de la forme simple H_2O ou hydrol, on a admis par la suite, qu'elle représentait un mélange de dihydrol et d'hydrol simple (Pascal [144]). Seuls les systèmes capillaires contiendraient de l'hydrol presque pur, principalement sous forme d'eau d'adsorption. Les travaux de Freyman [47,48], Abadie et coll. [1] ont montré, par l'analyse des spectres ultra-hertziens, que le point de congélation de l'eau d'adsorption se situe vers $-90^{\circ}C$.

Quant à la glace formée par cristallisation d'eau libre, sa symétrie cristalline la ferait considérer comme un trihydrol.

Plus récemment, l'étude des spectres flous obtenus par les rayons X, a permis de distinguer trois types principaux d'eau liquide : l'eau I, présentant une disposition moléculaire proche de celle de la tridymite et que l'on trouve en faible proportion au-dessous de $4^{\circ}C$; l'eau II, stable à la température ordinaire et dont la structure est voisine de celle du quartz ; enfin, l'eau III, hexagonale, des hautes températures (Pascal [144]). De ces diverses structures, Luyet [102] a proposé la représentation schématique suivante : l'eau est composée d'un réseau déformable de tétraèdres, entourant des cavités où un grand nombre de molécules se déplacent de façon arbitraire. Pour conclure, et comme le signale Paul Pascal, malgré les hypothèses récentes, on ne s'est guère éloigné de l'image ancienne que se faisait Roentgen de la structure de l'eau : une solution aqueuse de glace.

B. *La formation et le développement des cristaux de glace*

a) *Formation de la glace au cours de refroidissements lents.* Lorsque la température s'abaisse, l'eau pure se solidifie à $0^{\circ}C$, en présence de germes cristallins, pour

former de la glace avec libération de chaleur. La glace cristallise dans le système hexagonal et donne donc naissance à des cristaux biréfringents uniaxes. Cette transformation se fait de manière régulière à partir des centres de cristallisation qui apparaissent dans le liquide. Le passage à l'état cristallin peut alors s'interpréter (Luyet [102]) comme un blocage de molécules errantes dans une position définie, plutôt que résultant d'une addition massive d'éléments structuraux nouveaux.

La taille des cristaux de glace formés dépend principalement de la vitesse de refroidissement. Les plus petits cristaux s'obtiennent pour des vitesses élevées, et il faut, par contre, un refroidissement graduel pour que des cristaux de grande taille puissent se développer. Ceci s'explique aisément lorsque l'on considère que le nombre des centres germinatifs augmente avec la vitesse de refroidissement, et que, de ce fait, les cristaux étant plus nombreux, leur taille est fatalement plus réduite.

Si l'on continue à abaisser la température, la glace elle-même se refroidit, sans que sa structure semble évoluer. Toutefois, un séjour prolongé dans la zone des températures intermédiaires peut provoquer diverses modifications structurales. Il peut tout d'abord, dès -100°C et pour toutes les températures plus élevées, se produire un phénomène de recristallisation (« migratory recrystallization » des auteurs anglo-saxons) d'autant plus rapide que la température est plus élevée. Ce processus aboutit à la formation de cristaux plus gros à partir des petits cristaux initiaux. Nous l'avons déjà évoqué, et les figures 45 et 46 en donnent un exemple frappant. Il peut également se produire des phénomènes d'allotropie dynamique. Ainsi, de la glace cubique instable se forme parfois lors d'un refroidissement rapide, puis, à basse température, se transforme ultérieurement en sa variété tautomère hexagonale.

Enfin, pour clore cette brève étude des formes cristallines de la glace, il convient de signaler que la glace que l'on observe dans les conditions usuelles de pression et de température, correspond à la glace I de Bridgmann et ne représente qu'une seule des formes possibles de cristallisation de l'eau. Les variétés de glace II, III, V, et VI, ne se forment en effet, qu'à des pressions beaucoup plus élevées. Il n'est pas interdit toutefois de penser qu'en raison du défaut d'extensibilité de certains systèmes capillaires, il ne puisse pas se produire, au cours des refroidissements très rapides, certaines formes de glace haute-pression à l'intérieur des tissus.

b) Formation de la glace au cours des refroidissements rapides. Lorsque l'on refroidit un film d'eau tendu par capillarité à l'intérieur d'une boucle de fil métallique fin, dans un bain de propane liquide à -196°C , il reste transparent, et, observé entre nicols croisés, n'apparaît pas biréfringent. Par contre, si on le laisse se réchauffer, on le voit brutalement devenir opaque et optiquement actif. Cette

expérience, que nous avons réalisée souvent, montre que, dans certaines conditions, l'eau ne cristallise pas en se refroidissant. La congélation aboutit alors à un état particulier et très mal défini, l'état vitreux.

Nous aurons l'occasion de revenir sur l'état vitreux ultérieurement, mais nous voudrions, au passage, le décrire brièvement. Les solides qui se présentent à l'état vitreux, ont, le plus souvent, des propriétés isotropes. Leur viscosité est élevée et proche de 10^{13} poises. Il semble que, du point de vue structural, ils soient constitués par une matière fondamentale incoordonnée, contenant des éléments de répétition, arbitrairement répartis et voisins, la plupart du temps, de certains motifs structuraux rencontrés dans des cristaux de la même substance ou de ses dérivés (Pascal [144]) et appelés cristallites.

L'un des traits caractéristiques des verres est leur état instable. On peut, par chauffage progressif, les faire cristalliser en accroissant la liberté moléculaire. Il s'agit alors d'un processus de dévitrification. Dans le cas de l'eau, il est très difficile d'isoler la forme vitreuse pure, et l'on obtient presque toujours, un mélange d'eau cristalline et d'eau vitreuse. Cette dernière n'est d'ailleurs stable qu'à très basse température, et il ressort de nos expériences personnelles, comme des travaux antérieurs, qu'il est impossible de la conserver au-dessus de -130°C , et, encore plus, de la faire coexister avec de l'eau cristalline. En effet, tous les spécimens contenant des proportions variables de glace cristalline achèvent leur cristallisation en glace I, lorsque la température est élevée au-dessus de -129°C . Pour éviter ce phénomène et transformer directement la glace vitreuse en eau, il faut la réchauffer à très grande vitesse, pour qu'il y ait passage direct de l'état vitreux à l'état liquide. C'est ce que Luyet [104] a appelé la vitrofusion. Des gradients thermiques de plusieurs milliers de degrés par seconde sont alors nécessaires, ce qui implique des spécimens présentant une très grande surface pour un très faible volume.

2. CRISTALLISATION DES SOLUTIONS BIOLOGIQUES COMPLEXES

Dans l'organisme, et au sein des cellules vivantes, l'eau se trouve mêlée à de très nombreuses substances minérales et organiques. Leur présence apporte des modifications importantes dans les phénomènes de congélation. Nous envisagerons rapidement ce problème tout en soulignant les éléments théoriques qui nous semblent primordiaux dans cette étude.

A. Cristallisation d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 ‰

Lorsque l'on refroidit une solution aqueuse de chlorure de sodium proche de l'isotonie, soit 10 ‰, on constate que les premiers cristaux de glace apparaissent vers $-0,5^{\circ}\text{C}$ environ. Il s'agit là de l'abaissement cryoscopique normal. A partir

de ce point, la cristallisation progresse rapidement et de l'eau pure se sépare sous forme de glace. Au fur et à mesure que les cristaux s'accroissent, la phase liquide interstitielle diminue et sa concentration saline augmente. Vers -60°C , il s'est formé déjà 90 % de glace. Il ne reste alors plus que 10 % d'une solution à 100‰ de chlorure de sodium. La concentration en sel a donc été multipliée par 10.

Si l'on continue à abaisser la température, la séparation de glace se poursuit jusque vers -21°C , température à laquelle la solution interstitielle devient solide, comme nous le verrons plus loin.

Le pourcentage de glace formée et la température finale de solidification dépendent, sans nul doute, de la nature de la solution saline initiale, mais, dans l'ensemble, le phénomène est remarquablement constant pour les solutions physiologiques usuelles et ses conséquences sont très importantes. En effet, ainsi que nous l'avons signalé plus haut, l'apparition d'une solution fortement hypertonique entraîne pour les tissus un choc osmotique inévitable qui se manifeste bien avant que les effets mécaniques de la cristallisation aient pu se faire sentir. Lovelock [94] a particulièrement insisté sur cet aspect très spécial de l'action du froid. Le processus est en effet, le plus souvent réversible et, au cours du dégel, il apparaît des phases liquides à haute concentration saline qui se diluent progressivement au fur et à mesure que la glace fond.

Les altérations dues au choc osmotique et l'action directe des fortes teneurs en sels, doivent donc être constamment envisagées dès que l'on refroidit un matériel biologique quelconque à une température telle que de la glace apparaît au sein du spécimen. Il faut en effet souligner, de façon très nette, que la glace qui se forme est pure et que, par conséquent, l'intégralité du *matériel actif* ou *sensible* du spécimen, à la seule exception de l'eau, se trouve baignée par les solutions hypertoniques. Ainsi, lorsque l'on congèle une suspension cellulaire, les cellules se trouvent rassemblées dans les veines liquides situées entre les cristaux de glace. Si l'on prend, au contraire, un matériel tissulaire compact, l'ensemble des substances constitutrices du cytoplasme et du nucleoplasme est progressivement imprégné par les phases liquides formées dans les interstices des cristaux de glace intra-cellulaire. Il est bien évident que cela entraîne de nombreuses altérations et il semble que l'on ait eu trop souvent tendance à négliger ce point de vue dans les études portant sur la congélation des systèmes biologiques.

En dehors du phénomène que nous venons de décrire, la présence de sels divers dans une solution aqueuse apporte des modifications sensibles dans le processus même de cristallisation. Comme nous le verrons ultérieurement, la vitesse de propagation de la cristallisation se trouve en effet abaissée et la taille des cristaux est généralement plus réduite.

B. Cristallisation des solutions biologiques complexes

L'eau des tissus vivants ne contient pas seulement des sels minéraux et des substances organiques de bas poids moléculaire. Elle renferme aussi de très larges quantités de composés de poids moléculaire élevé conférant aux solutions biologiques la nature colloïdale, par suite du caractère macro-moléculaire de leurs constituants. Le protoplasme, comme le noyau, représente une architecture délicate où des systèmes colloïdaux complexes coexistent en équilibre moyen les uns avec les autres et subissent des changements perpétuels de la forme sol à la forme gel, avec tous les intermédiaires possibles. La cristallisation de systèmes aussi structurés ne se fait pas sans perturbations. Certains équilibres se trouvent rompus, d'autres subsistent.

L'étude précise de ces phénomènes est très difficile par suite du haut degré de complexité de la matière vivante. On peut l'envisager soit sous l'angle physique, soit également sous l'incidence biochimique. Du point de vue physique, il ressort des diverses recherches menées dans cette direction, en particulier par Luyet et son équipe [103] que, selon la teneur en eau du système et le gradient thermique auquel il est soumis, la cristallisation peut revêtir des formes très variables, depuis les masses cristallines régulières et hexagonales, jusqu'au feutrage de microcristaux.

Il est certain que les grosses molécules, non seulement modifient la forme et la vitesse de cristallisation, mais contribuent en plus à transformer le degré de liberté de l'eau elle-même. Par suite de leurs propriétés colligatives, une certaine quantité d'eau se trouve liée et, par là même, ne peut cristalliser normalement. Ainsi, par exemple, un gel formé à base de gélatine et contenant moins de 35 % d'eau, peut être refroidi à très basse température sans que jamais il n'apparaisse de glace. Si la teneur en eau dépasse 35 %, la glace qui se forme alors provient exclusivement de l'eau libre qui est en excès sur les 35 % d'eau liée (Moran [120]).

Lorsque l'on envisage le point de vue biochimique, il est certain que le refroidissement d'un tissu peut entraîner des modifications considérables dans l'évolution normale des équilibres dynamiques intracellulaires. Il peut, en particulier, se produire un déséquilibre enzymatique. Dans une même réaction, l'activité enzymatique décroissant plus vite que les processus de diffusion, la réaction ne peut plus s'équilibrer. Dans les chaînes de réaction, les diverses diastases ne sont pas inhibées de la même façon. Il peut en résulter, à l'intérieur du protoplasme, une accumulation anormale de métabolites intermédiaires, dont l'existence est normalement transitoire et qui peuvent, au dégel, soit s'avérer toxiques, soit donner au métabolisme une orientation différente.

En liaison même avec les phénomènes colloïdaux, on peut penser qu'il se

produit parfois, une désorganisation mécanique des relations existant entre les enzymes et leurs substrats. Un changement de configuration des molécules protéiques peut produire un défaut de coaptation de l'enzyme avec la partie réceptrice de la molécule et la réaction peut ainsi être incomplète ou totalement inhibée. Il peut enfin, au cours du dégel, apparaître des enzymes actifs perturbant le métabolisme, par suite de la dissociation de certaines molécules protéiques, en particulier des lipoprotéines.

Il semble donc que l'étude physico-chimique précise de la congélation des tissus, soit à peu près impossible par suite de son degré de complexité. L'expérience a prouvé toutefois, que, de même qu'un organisme aussi hautement structuré qu'un être vivant obéissait à des lois physiologiques simples, de même l'ensemble des réactions physico-chimiques d'un tissu complexe à l'égard des basses températures pouvait, dans une certaine mesure, s'expliquer à partir de modèles très simples soumis à des lois relativement bien définies.

C'est dans cet état d'esprit que nous avons abordé nos recherches physico-chimiques et nous avons toujours essayé de déduire, des observations réalisées sur des solutions simples, le comportement à basse température de tissus animaux entiers. Nous l'avons fait en suivant progressivement les phases du refroidissement et en étudiant les principaux changements structuraux que l'on pouvait apercevoir à l'intérieur de zones thermiques de plus en plus basses. C'est pourquoi nous envisagerons d'abord les phénomènes de cristallisation de l'eau lors du refroidissement initial.

II. Etude expérimentale de la propagation de la cristallisation dans les systèmes biologiques au cours du refroidissement initial

Le plus souvent, l'eau cristallise à 0° C quand la température s'abaisse. Cependant, lorsque la liberté moléculaire se trouve entravée par un phénomène quelconque et en particulier, dans les systèmes capillaires, l'eau peut rester en surfusion, c'est-à-dire rester liquide à des températures inférieures à 0° C. On dit alors qu'elle est sous-refroidie. Par suite du très grand degré de division de l'eau à l'intérieur des cellules, le phénomène de surfusion tient une place importante dans le cadre général du refroidissement des tissus.

L'eau pure sous-refroidie se trouve dans un état métastable et, en général, cristallise spontanément. Un choc mécanique, un choc thermique, la présence d'une impureté, bien plus encore, l'introduction d'un cristal de glace ou d'un cristal isomorphe, suffisent à amorcer la cristallisation qui est alors très brutale. Par contre, les solutions aqueuses contenant des sels minéraux ou des substances

organiques sont beaucoup moins instables et la surfusion peut être plus longue. Ceci est encore plus net dans le cas des tissus où toutes les conditions se trouvent réunies pour permettre le maintien de l'eau à l'état liquide en-dessous de 0° C.

Cela explique pourquoi de très nombreux auteurs ont réussi à conserver vivants des tissus, voire même des animaux, après un séjour prolongé au-dessous de 0° C. Kalabuchov [77] et Smith [189] ont montré que, dans ce cas, l'eau était restée liquide. Kalabuchov [77] qui a maintenu des abeilles à des températures de -17° C, a ainsi constaté que le degré de survie était toujours de 10 % lorsque la cristallisation ne s'était pas produite.

Dans certains cas, le durcissement consécutif à la cristallisation n'indique pas forcément que toute l'eau qui pouvait cristalliser s'est effectivement transformée en glace. Nous avons vu que la cristallisation était, en général, d'abord extra-cellulaire et qu'il fallait une température plus basse pour que l'eau intra-cellulaire se congèle. La membrane cellulaire joue ainsi un rôle d'arrêt et empêche que des cristaux de glace viennent ensemençer les milieux intra-cellulaires sous-refroidis. Ceci pose le problème de la propagation de la cristallisation à travers la paroi cellulaire. Lusena et Cook [97] grâce à l'emploi de membranes artificielles, ont pu montrer que des membranes très perméables aux liquides pouvaient être plus ou moins perméables, voire même imperméables aux cristaux de glace. Il semble que ces différences ne soient pas dues au degré d'hydratation de la membrane elle-même, mais qu'elles dépendent plutôt de sa nature, de la vitesse de congélation et de la concentration en substances dissoutes du liquide environnant. Pour un matériel donné, la perméabilité aux cristaux de glace augmenterait toutefois avec la porosité de la membrane.

De toute manière, lorsque la température est suffisamment basse, le milieu intra-cellulaire cristallise, soit qu'il ait été ensemençé par passage de cristaux de glace à travers la membrane, soit que spontanément, des centres germinatifs s'y soient formés.

La plupart du temps, le refroidissement initial s'accompagne donc d'une surfusion préalable qui cesse brusquement à une certaine température. Comment se fait alors la propagation de la cristallisation à partir du centre germinatif ? Dans quelle mesure l'addition de glycérol modifie-t-elle ce phénomène ? Ce sont là deux questions principales dont nous avons voulu entreprendre l'étude expérimentale.

I. PRINCIPE DE TRAVAIL ET SOLUTIONS DE RÉFÉRENCE

Au cours de l'ensemble de nos recherches physiques, nous avons toujours commencé par l'étude de solutions simples ainsi que nous l'avons déjà signalé. Nous avons voulu, en particulier, étudier dans chaque cas, le comportement de l'eau pure, de la solution aqueuse de chlorure de sodium, d'une solution physio-

logique complexe contenant un mélange de sels, et d'un tissu de référence. Chaque fois, nous avons recherché quelle était l'influence d'une addition de glycérol. Le tableau ci-dessous groupe les diverses solutions de référence et systèmes biologiques que nous avons étudiés, et indique le symbole que nous avons choisi pour les représenter graphiquement.

<i>Solution de référence</i>	<i>Symbole</i>
Eau bidistillée sur quartz	E
— + Glycérol	ER
Solution aqueuse à 10 % de ClNa (Merck)	ClNa ₁
— + Glycérol	ClNa ₁ G
Liquide physiologique de Tyrode	T
— + Glycérol	TG
Solution physiologique d'Earle	ER
— + Glycérol	ERG
Solution physiologique dérivée de la solution d'Earle et ne contenant que les chlorures	SCI
 <i>Systèmes biologiques</i>	
Sérum normal de cheval	Sr
Sang humain complet citraté (Centre National de Transfusion de l'Armée)	S
— + Glycérol	SG
Milieu solide de culture (Plasma de poulet + extrait embryonnaire de poulet à 50 %)	PEE ₅₀
— (extrait à 25 %)	PEE ₂₅
— + Glycérol	PEE ₂₅ G
Foie entier (veau ou porc)	F
Foie broyé	FB
Foie coupé en morceaux	FM
— + Glycérol	FMG

2. MÉTHODES D'ÉTUDE

Le principe général de notre méthode de travail consiste à mesurer la vitesse de cristallisation en fonction du degré de surfusion. Il était donc nécessaire de pouvoir déterminer tout d'abord le degré de surfusion et, à cet effet, de connaître l'abaissement cryoscopique des solutions étudiées.

A. Détermination du point de cristallisation commençante

Nous avons employé pour cela, la technique cryométrique classique. La solution (environ 5 cm³) est placée dans un tube de pyrex, lui-même contenu dans un deuxième tube plus large, ce qui ménage un espace d'air annulaire entre les

deux parois. L'ensemble des deux tubes peut être immergé dans un vase Dewar transparent contenant un mélange réfrigérant (neige carbonique-éthanol). Dans le tube-laboratoire interne, se trouve un thermomètre de précision. Une agitation continue est réalisée par barbotage d'air sec filtré. La méthode de travail est simple. On abaisse progressivement la température tout en ajoutant de petits cristaux de glace. La température de cristallisation commençante est déterminée à la fois par l'apparition de nombreux cristaux dans la solution et par l'existence d'un phénomène d'invariance thermique. Chaque détermination fait l'objet d'une dizaine de mesures dont on a pris la valeur moyenne.

Il est connu depuis fort longtemps, que l'abaissement cryoscopique des solutions isotoniques aux liquides cellulaires, est proche de $0,5^{\circ}\text{C}$, et nous l'avons effectivement vérifié. Le tableau ci-dessous groupe nos résultats numériques (pour certains d'entre eux, le chiffre moyen correspondant à divers lots a été donné).

<i>Solution</i>	$\Delta^{\circ}\text{C}$
Solution aqueuse de ClNa à 10 ‰	— 0,63
— physiologique de Tyrode	— 0,62
— — d'Earle	— 0,65
Sérum de cheval	— 0,57
Sang humain complet citraté	— 0,6
Foie entier	— 1,0
	— 2,0
Foie broyé	— 0,9

L'addition de glycérol provoque un abaissement considérable de la température de cristallisation commençante. La figure 47 montre la courbe correspondant au système binaire eau-glycérol. L'addition de sels ne modifie pas de façon sensible les données précédentes et les diverses solutions physiologiques se comportent à cet égard, de manière identique (figure 47).

Au-delà d'une teneur de 66 ‰ en glycérol, il devient pratiquement impossible d'obtenir la cristallisation. Toutefois, jusqu'à cette limite, on peut mesurer une température de cristallisation commençante. Le degré de surfusion se définit alors comme la valeur absolue de la différence entre la température réelle du liquide sous-refroidi et la température de cristallisation commençante du même liquide dans des conditions normales de pression.

B. Mesure de la vitesse de cristallisation à température contrôlée

Le principe de la mesure consiste à ensemencer avec un germe cristallin, le liquide sous-refroidi, et à mesurer la vitesse de propagation de la cristallisation. On trace alors la courbe portant les vitesses de cristallisation en fonction du degré de surfusion.

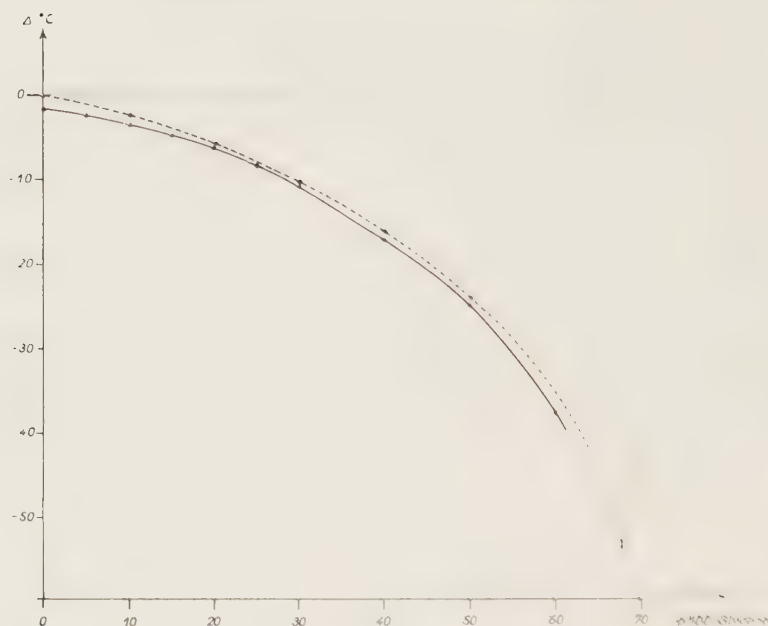


Figure 47. Courbe d'abaissement cryoscopique des solutions glycérolées
 ----- mélanges H_2O — glycérol
 ————— mélanges liquide d'Earle — glycérol

Le montage expérimental est réalisé de la façon suivante (figure 48). Le système étudié est contenu dans un tube capillaire vertical en pyrex, de 0,5 mm de diamètre et de 4 mm d'épaisseur de paroi environ. Ce tube, fermé à sa partie inférieure par une plaque de verre rouge, dont l'étanchéité est assurée par de la graisse silicone, est placé dans un bain d'alcool où un barbotage d'air sec assure l'uniformité thermique. Un thermomètre de précision indique la température. Une couche d'huile silicone isole thermiquement la surface du bain de l'extérieur. Le tube contenant l'alcool porte deux repères annulaires, horizontaux et parallèles, distants de 50 mm. Il est sondé par sa partie supérieure à une enceinte Dewar transparente où peut circuler de l'alcool froid provenant d'un thermostat à pompe de circulation où un piège permanent à glace carbonique permet l'obtention de températures inférieures à $0^{\circ}C$, et soigneusement contrôlées. La stabilité thermique dans le bain central est supérieure au 1/10 de degré. Grâce à la transparence des diverses enceintes, on peut observer le capillaire; cet examen s'effectue d'ailleurs en lumière polarisée, en position *crossed*, les disques neutres du polariseur et de l'analyseur faisant un angle de 45° avec l'axe du capillaire. Un réservoir d'eau, épais, empêche toute surchauffe éventuelle qui pourrait provenir du système d'éclairage. La solution est placée dans

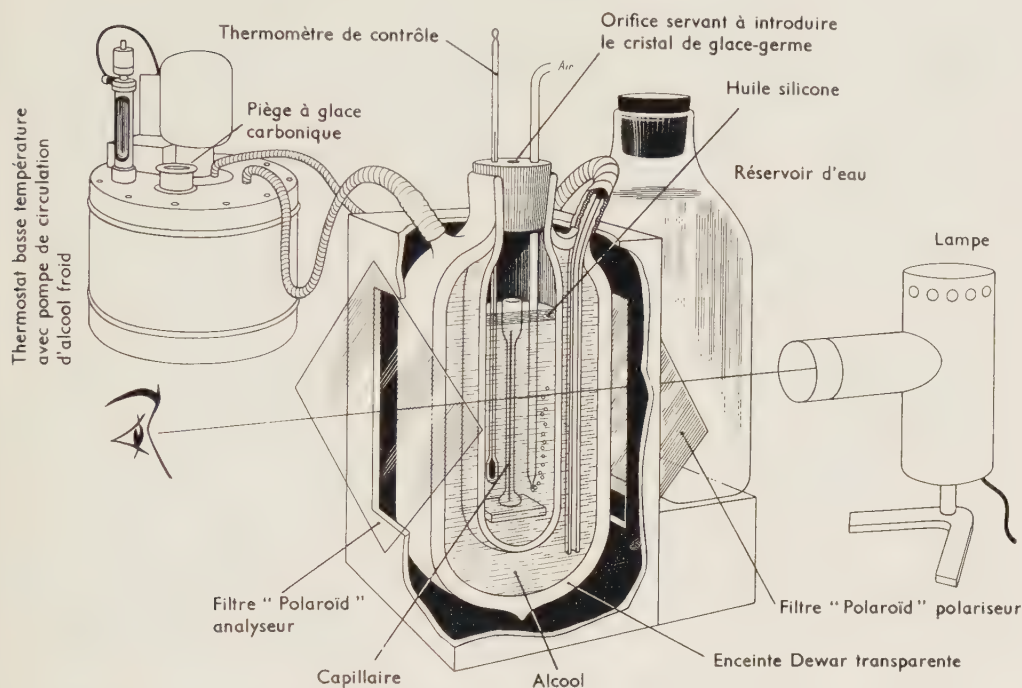


Figure 48. Vue d'ensemble du dispositif utilisé pour la mesure des vitesses de cristallisation de solutions sous-refroidies. L'examen se fait en lumière polarisée entre nicols croisés. Les lignes neutres des deux filtres *Polaroid* sont à 45° de la direction du capillaire.

le capillaire, puis l'excès de liquide est soigneusement pompé. On met alors le tube dans le bain réfrigérant et on laisse l'équilibre s'établir (15 minutes). Par un orifice central du bouchon, on introduit un germe de cristallisation à la partie supérieure du capillaire en le touchant avec l'extrémité d'une pipette contenant de la glace. La surfusion cesse et la cristallisation se propage le long du capillaire. Le front de cristallisation est très visible par suite de la biréfringence de la glace. On mesure alors le temps de passage entre les deux repères grâce à un chronomètre au $1/50$ de seconde. Les repères étant tracés sur le tube extérieur et non sur le capillaire lui-même, aucune erreur de parallaxe ne peut avoir lieu. Chaque chiffre expérimental représente la valeur moyenne d'une dizaine de mesures.

3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Notre problème principal étant d'étudier la physique de l'action des basses températures sur les tissus et le mécanisme de la protection due au glycérol, nous envisagerons successivement la cristallisation des diverses solutions et pour chacune d'entre elles, l'influence de l'addition du glycérol.

Cependant, avant de commencer cette étude, nous voudrions préciser les données du problème. En effet, lorsqu'un liquide sous-refroidi cristallise, il convient de tenir compte de deux phénomènes différents. Ainsi, pour qu'il apparaisse de la glace, il faut, d'une part, qu'il existe ou qu'il se forme des germes de cristallisation, et, d'autre part, que des cristaux se développent à partir de ces centres germinatifs. Cela nécessite donc, qu'il se constitue un agrégat cristallin d'une taille au moins égale à une certaine grandeur critique dépendant de la température pour qu'il puisse subsister, et que la vitesse de cristallisation soit différente de zéro. Lorsque les centres germinatifs se forment spontanément au sein de la solution, il s'agit de la *cristallisation homogène* telle que la définit Volmer [208]. C'est elle qui prédomine au cours du refroidissement d'un tissu, puisque, généralement, il n'existe pas de germe préexistant déclenchant la cristallisation, surtout dans les cas où l'on observe un phénomène de surfusion. Les deux phénomènes, apparition des germes et propagation de la cristallisation, dépendent, nous l'avons dit, de la température, et les courbes que l'on a pu tracer dans des cas favorables, présentent un maximum dans chaque cas. Les positions de ces maxima ne coïncident d'ailleurs pas forcément et il existe des corps, tels que le bétol, où ils sont tellement distants, que le liquide ne manifeste pas de phénomène de cristallisation homogène et que l'on est obligé de recourir à l'ensemencement pour obtenir la cristallisation.

Toutefois, dans le cas qui nous préoccupe, les courbes ont une large région commune, que l'on s'adresse à l'eau ou au glycérol, et la probabilité de formation des germes est toujours très élevée dans le domaine de température qui correspond à la période initiale de refroidissement. D'ailleurs le problème qui nous intéresse n'est pas de savoir comment apparaissent les premiers cristaux de glace, mais plutôt de connaître comment ils évoluent. Aussi avons-nous volontairement négligé le problème de la formation des germes, pour nous intéresser exclusivement à la propagation de la cristallisation à partir de germes artificiellement introduits dans la solution.

Nous avons pu toutefois vérifier que, dans les cas où la surfusion cessait spontanément, la vitesse de cristallisation mesurée était identique à celle que l'on calculait lorsque la solution étaitensemencée directement. C'est donc par cette dernière méthode seulement que nous avons obtenu les résultats suivants :

A. Eau bidistillée

a) *Eau pure.* Le comportement de l'eau pure sous-refroidie, est très curieux. La vitesse de cristallisation le long du tube capillaire apparaît tout d'abord indépendante du diamètre du capillaire lorsqu'il reste compris entre 0,1 et 2 mm ; cela est également valable pour les autres systèmes que nous avons étudiés. Elle augmente par contre, considérablement avec le degré de surfusion (41,3 mm /s

à $-7,2^{\circ}\text{C}$, Tammann et Buchner [201] ; 65 mm/s à -8°C , Walton et Judd [212] ; 96,8 mm/s à $-13,4^{\circ}\text{C}$, Tammann et Buchner [201]). Pour étudier plus facilement ce phénomène, nous avons filmé à 60 images par seconde, la cristallisation à l'intérieur des tubes. Par suite de sa très grande vitesse, la cristallisation est discontinue. Elle se fait par bonds successifs et lorsque le front cristallin a atteint l'extrémité du tube, le capillaire contient une série régulière de cristaux de glace, séparés par de l'eau à 0°C . L'eau interstitielle cristallise alors lentement pendant les secondes qui suivent à partir des parois et des cristaux déjà formés. La cristallisation est totale au bout de 5 à 10 secondes et la température s'abaisse alors à nouveau (Rey-Dhaussy et Rey [173]).

b) Système binaire Eau-Glycérol (figure 49, EG). Lorsque l'on ajoute du glycérol, il se produit une baisse considérable de la vitesse de cristallisation, qui devient d'autant plus faible que le pourcentage de glycérol est plus élevé. La taille des cristaux formés est également plus réduite et la cristallisation a tendance à se faire de manière hélicoïdale. La figure 49 montre que pour 15 % de glycérol, la variation de la vitesse de cristallisation en fonction du degré de surfusion devient presque linéaire.

Le rôle principal du glycérol nous semble donc être, d'une part d'abaisser la température de cristallisation commençante, et, d'autre part de diminuer la vitesse de propagation du front cristallin.

B. Liquide physiologique de Tyrode

a) Tyrode pur (figure 50, T). L'addition de sels à l'eau a pour effet d'abaisser de façon sensible la vitesse de cristallisation qui, toutefois, reste élevée et augmente également avec le degré de surfusion.

b) Mélanges Tyrode-Glycérol (figure 50, TG). L'addition de glycérol au liquide physiologique aboutit au même résultat que pour l'eau distillée, un abaissement important de la vitesse de cristallisation. Ainsi, pour un même degré de surfusion de 5°C , la présence de 15 % de glycérol suffit à faire passer la vitesse de cristallisation de 10 à 1,5 millimètres par seconde.

C. Systèmes biologiques divers

Reproductibilité des expériences. Il pouvait sembler tout d'abord, que dans un matériel aussi hétérogène et complexe qu'un système biologique aucune mesure précise de la vitesse de cristallisation ne pouvait être réalisée. Cependant, l'expérience a prouvé que l'on pouvait obtenir des valeurs très reproductibles. Nous en donnerons deux exemples :

a) Sérum de cheval (figure 51, Sr). La cristallisation est plus lente, par suite de la présence de protéines, mais sa vitesse est remarquablement constante d'un lot

Variation de la vitesse de cristallisation de solutions sous-refroidies en fonction du degré de surfusion

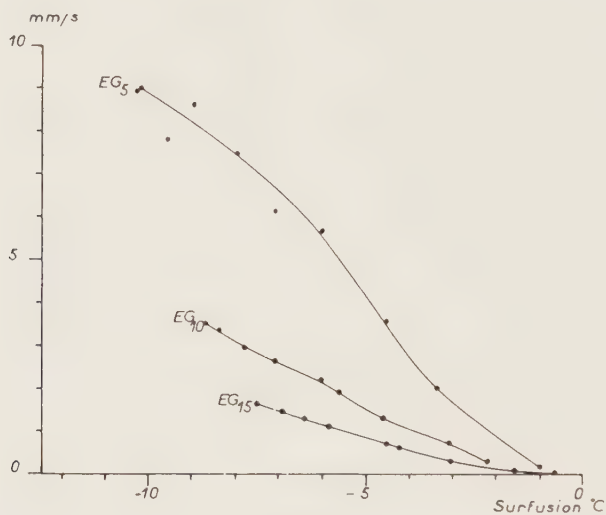


Figure 49

EG₅ : solution aqueuse de glycérol à 5 %
 EG₁₀ : solution aqueuse de glycérol à 10 %
 EG₁₅ : solution aqueuse de glycérol à 15 %.

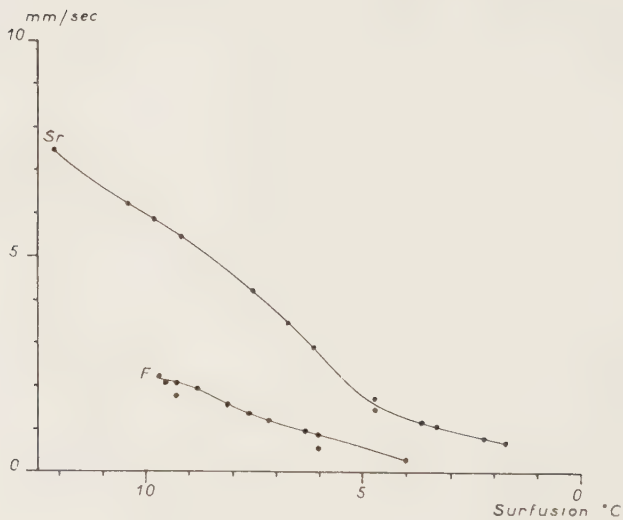


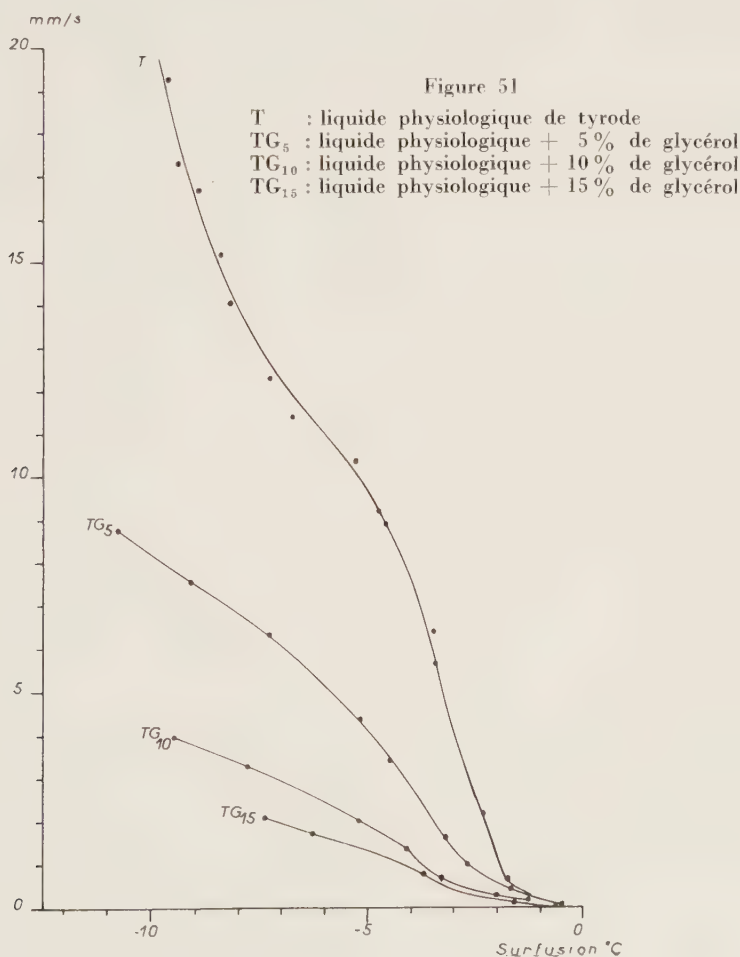
Figure 50

Sr : sérum de cheval frais
 F : foie de veau frais entier.

à l'autre de sérum. Pour un degré de surfusion de 5°C , elle est d'environ 2 mm par seconde, soit inférieure de 5 fois environ à celle du liquide physiologique de Tyrode.

b) *Foie de porc entier* (figure 51, F). Le foie entier de porc, injecté progressivement sous pression dans le capillaire, cristallise plus lentement que le sérum de cheval, mais, là encore, il existe un accord excellent entre les chiffres obtenus pour des foies provenant d'animaux différents. Pour un degré de surfusion de 5°C , on trouve 0,7 mm par seconde environ, soit près de 3 fois moins que pour le sérum de cheval.

Variation de la vitesse de cristallisation de solutions sous-refroidies en fonction du degré de surfusion (suite)



Variation de la vitesse de cristallisation de solutions sous-refroidies en fonction du degré de surfusion (suite)

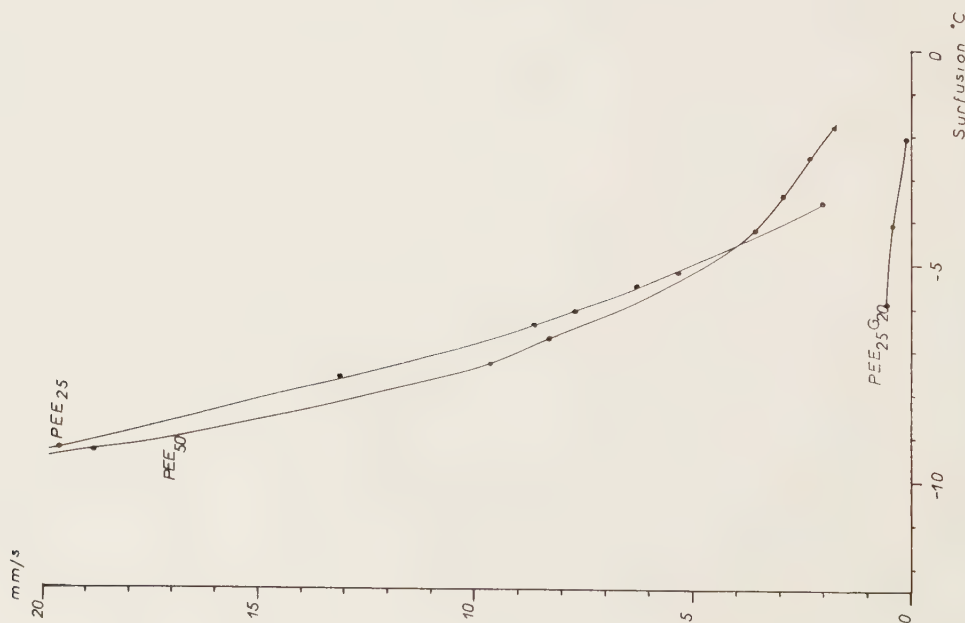


Figure 52

PEE₂₅ : mélange solide, plasma — extrait embryonnaire à 25 %
 PEE₅₀ : mélange solide, plasma — extrait embryonnaire à 50 %
 PEE₂₅G₂₀ : mélange solide, plasma — extrait embryonnaire à 25 %
 PEE₂₅G₂₀ : mélange solide, plasma — extrait embryonnaire à 25 %

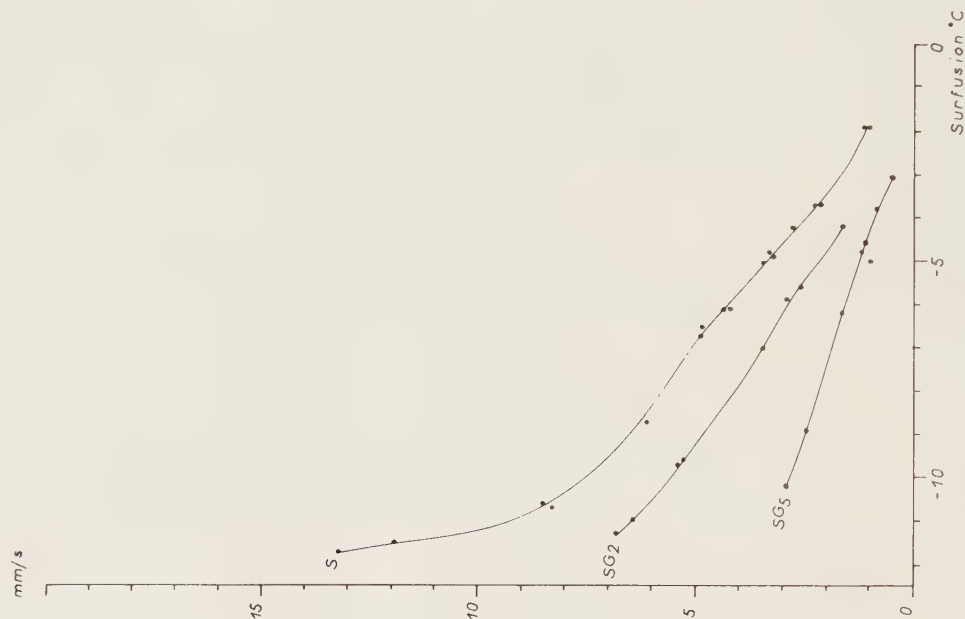


Figure 53

S : Sang citraté complet du C. T. R. A. (Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée).
 SG₂ : Sang citraté complet + 2 % de glycérol
 SG₅ : Sang citraté complet + 5 % de glycérol
 SG₂₀ : Sang citraté complet + 20 % de glycérol

Influence de l'addition de glycérol

a) *Milieu de culture solide* (figure 52, PEE). En l'absence de glycérol, la vitesse de propagation de la cristallisation dans le milieu solide est élevé, et, à certaines températures, voisine de celle du liquide physiologique. Ceci montre combien l'état physique du milieu joue un rôle important. En effet, malgré la présence de protéines en quantité notable, la vitesse de cristallisation diffère peu de celle de l'extrait embryonnaire seul, qui est elle-même pratiquement identique à celle du liquide physiologique. Contrairement à ce qui se passe dans le cas du sérum, on est donc conduit à penser que la propagation de la cristallisation se fait principalement par les cavités contenant de la solution saline liquide, situées à l'intérieur des mailles du gel.

L'addition de glycérol provoque un véritable effondrement de la vitesse de cristallisation. Ainsi, pour 25 % de glycérol et un degré de surfusion de 5° C, on passe de 5 à 0,5 mm par seconde, soit une chute de 10 fois.

b) *Sang humain complet citraté* (figure 53, S). Le sang humain complet citraté, tel que nous l'avons grâce à l'obligeance du Centre de Transfusion-Réanimation de l'Armée, cristallise assez rapidement (3,2 mm/s pour un degré de surfusion de 5° C). Nous sommes ici en présence d'un système hétérogène et il y a lieu de se demander si la cristallisation est plus rapide dans le plasma ou à l'intérieur des globules. Il semble que ce soit le plasma qui exerce une influence dominante parce qu'il cristallise le plus lentement, comme l'indique le tableau suivant.

<i>Solution</i>	<i>Degré de surfusion</i>	<i>Vitesse de cristallisation mm/s</i>
Sang complet	— 9,9	7,0
Plasma (obtenu par décantation)	— 9,8	6,3
Globules rouges seuls (obtenus par décan- tation)	— 9,9	14,7

Il est curieux de noter que le chiffre de 6,3 obtenu pour le plasma humain citraté, n'est guère éloigné de celui de 5,9 correspondant au sérum de cheval, pour le même degré de surfusion de 9,9° C. Cela semble indiquer que les protéines sanguines ont, dans le phénomène de cristallisation, un rôle déterminant, que la présence de sels (citrate) ou de certains composés organiques (fibrinogène) n'est pas susceptible de modifier de façon sensible.

L'addition de glycérol produit aussi, dans le cas du sang (SG), une très

forte baisse de la vitesse de cristallisation. Pour un degré de surfusion de 5° C, 5 % de glycérol suffisent en effet, à l'abaisser de 3.2 à 1.3 mm par seconde. Ceci est d'ailleurs d'autant plus sensible que le degré de surfusion est plus élevé.

Conclusion

Les diverses considérations théoriques ainsi que les données expérimentales que nous venons d'exposer, montrent que, au cours des premières étapes du refroidissement d'un système biologique complexe, un tissu par exemple, il se produit un certain nombre de phénomènes caractéristiques.

Après un degré variable de surfusion, il apparaît des cristaux de glace, péri-cellulaires et intra-cellulaires, dont la vitesse d'accroissement dépend, d'une part du degré de surfusion, et d'autre part, de la nature du milieu. La présence de sels divers et de substances organiques à poids moléculaire élevé, produit un abaissement sensible de la vitesse de cristallisation de l'eau seule, et nos résultats se rapprochent ainsi de ceux de Lusena [96 à 98].

Quant à l'addition de glycérol, elle exerce une très grande influence sur la cristallisation qui devient lente, en même temps que la taille des cristaux formés diminue. De plus, la température de cristallisation commençante est fortement abaissée tandis que s'accroît la tendance à la surfusion.

Là, cependant, ne se limite pas le rôle du glycérol. En effet, il convient de rappeler que, lors de la formation des cristaux de glace, il s'est constitué à l'intérieur du milieu, des phases liquides fortement hypertoniques, qui n'achèvent leur solidification qu'à des températures notablement plus basses. Ici, apparaît, de façon très claire, l'un des rôles majeurs du glycérol. Au cours du refroidissement, comme il ne cristallise pas en même temps que l'eau, il se concentre progressivement dans les espaces intercrystallins et, de ce seul fait, dilue les solutions salines et maintient leur concentration relativement basse. De plus, diffusant rapidement à l'intérieur des cellules, il contribue à rétablir l'équilibre osmotique et, dans une large mesure, évite donc le choc osmotique.

Ce rôle de diluant, improprement appelé par Lovelock [94], « pouvoir tampon » du glycérol, joint aux propriétés modératrices qu'il manifeste vis-à-vis de la formation et de la propagation de la glace, explique certainement, dans une large mesure, pourquoi il protège les tissus au cours des premières étapes du refroidissement.

Cependant, la température va continuer de s'abaisser et il nous faut maintenant envisager les phénomènes qui se produisent en-dessous de — 20° C, dans cette zone des températures intermédiaires qui s'étend jusque vers — 80° C, et où l'on a souvent tendance à croire, bien à tort, que, tout devant être solide, il ne s'y passe rien. Ce sera l'objet de notre prochain chapitre.

Le passage des températures intermédiaires. Formation et cristallisation des mélanges eutectiques

L'étude des premières phases du refroidissement vient de nous montrer que, en général, lorsque la température atteint -20°C , le tissu est devenu solide et contient une proportion importante de glace. Les cristaux de glace, toutefois, restent séparés par des phases liquides complexes, dont la teneur saline est élevée, et qui baignent directement les structures sensibles du matériel congelé. Qu'advient-il, alors, de ces solutions interstitielles lorsque la température continue à s'abaisser ? L'observation directe peut résoudre partiellement ce problème, mais c'est principalement en faisant appel à des méthodes indirectes que nous avons pu l'étudier.

On peut penser, à priori, que l'existence des phases liquides est uniquement transitoire, et, qu'à une certaine température, la cristallisation est totale. Il est alors logique d'admettre qu'en dessous de cette température à laquelle tout est devenu solide, il n'existe plus de danger d'altération possible par les solutions hypertoniques. Si notre hypothèse est correcte, la détermination précise de la température de solidification complète revêt donc une très grande importance, car elle constitue la borne supérieure de la zone de températures à l'intérieur de laquelle on peut espérer entreprendre la conservation de longue durée de tissus vivants.

C'est dans ce but précis que nous avons été amenés à développer des méthodes purement physiques, permettant de suivre la naissance et l'évolution des résidus liquides à l'intérieur des substances étudiées, au cours des phases de congélation et de dégel. Nous les exposerons brièvement.

I. Méthodes d'étude

Les techniques que nous avons utilisées pour permettre l'observation directe à basse température, ont été décrites à propos des phénomènes de congélation à l'échelle cellulaire, aussi n'y reviendrons-nous pas. Nous envisagerons au contraire, de façon plus détaillée, la méthode électrique.

1. PRINCIPE DE LA MESURE

Depuis fort longtemps déjà, on sait que l'eau distillée, et, plus encore la glace, constituent de très bons isolants électriques. Par contre, les solutions d'électrolytes ont une résistivité souvent très faible. C'est pourquoi, nous avons pensé qu'il serait possible de savoir si une solution congelée contenait une phase liquide hypertonique, en étudiant sa résistance électrique globale.

2. DESCRIPTION DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL (figure 54)

Pour éviter les phénomènes d'électrolyse et la polarisation des électrodes, nous avons travaillé en courant alternatif basse fréquence avec des électrodes en platine-platiné. La figure 54 donne un schéma de l'ensemble du dispositif.

A. Schéma général

La solution étudiée est contenue dans une cellule d'examen spéciale, plongée dans le bain liquide d'un cryostat où une hélice de brassage assure l'homogénéité thermique. Une résistance électrique chauffante, immergée dans le bain réfrigérant, permet de le réchauffer à volonté en agissant sur un alternostat. Un thermocouple, placé dans la cellule d'examen et relié à un pyromètre, indique la température de la solution, tandis qu'un second couple thermoélectrique, placé dans la glace fondante, fournit la température de référence. Quant à la mesure de la résistance électrique de la solution contenue dans la cellule d'examen, elle se fait grâce à un pont de mesure standard alimenté par un générateur basse fréquence. Un transformateur de liaison, de rapport 1,1, est nécessaire pour raccorder la sortie dissymétrique du générateur à l'entrée symétrique du pont de mesure.

B. Bain réfrigérant

Le bain réfrigérant qui contient la cellule d'examen est constitué par une enceinte isotherme, fortement calorifugée et contenant deux litres d'alcool absolu, auquel on ajoute de la neige carbonique. Le liquide est constamment brassé à l'aide d'un petit moteur électrique pourvu d'une hélice de pyrex.

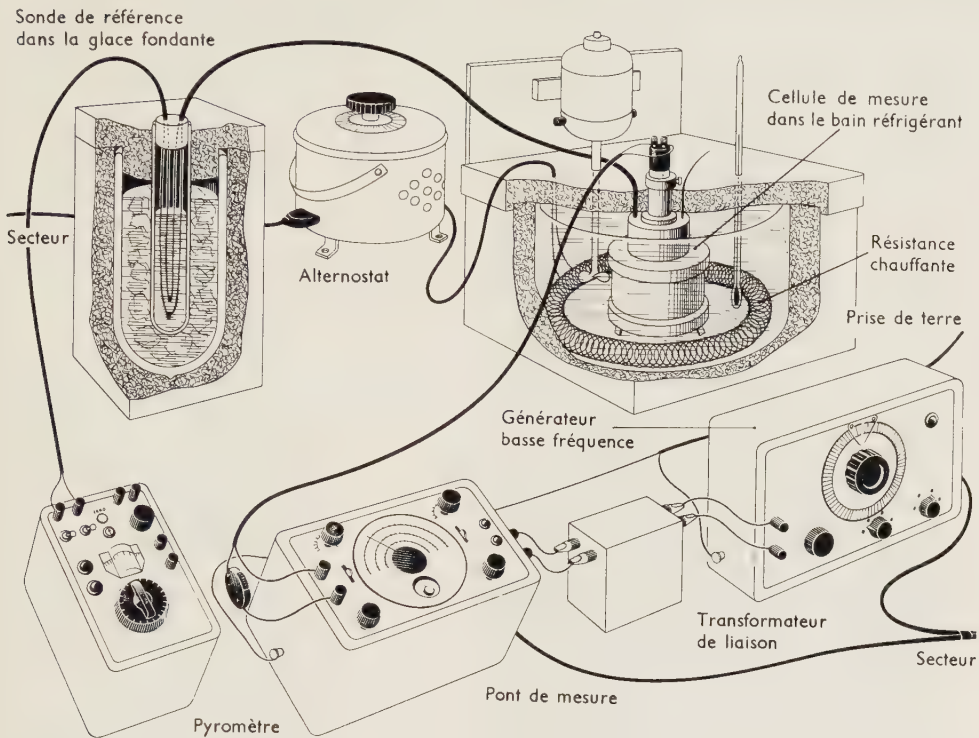


Figure 54. Montage utilisé pour la mesure de la résistivité électrique de solutions congelées en courant alternatif basse fréquence.

C. Cellule d'examen (figures 55, 56 et 57)

La cellule d'examen est constituée par une masse métallique épaisse en acier inoxydable, percée d'une cavité cylindrique centrale, de 20 cm³ environ de capacité, et pourvue d'un niveau latéral. Un trou allongé et étroit permet de placer une thermosonde à proximité de la solution. La cellule elle-même s'emboîte à frottement très doux dans une deuxième pièce d'acier inoxydable, plus large, qui joue le rôle de *tampon thermique* et de réserve de froid. A l'intérieur de la cavité centrale du premier cylindre d'acier, pénètre une pièce cylindrique en verre, portant les deux électrodes qui sont scellées dans une position indéformable. L'ensemble peut se démonter aisément comme l'indique la figure 57.

D. Technique d'utilisation

L'installation que nous venons de décrire nous a permis d'étudier la résistance électrique de nombreux systèmes biologiques, dont certains contenaient du

Cellule de mesure de résistivité



Figure 55. Ensemble de la cellule de mesure

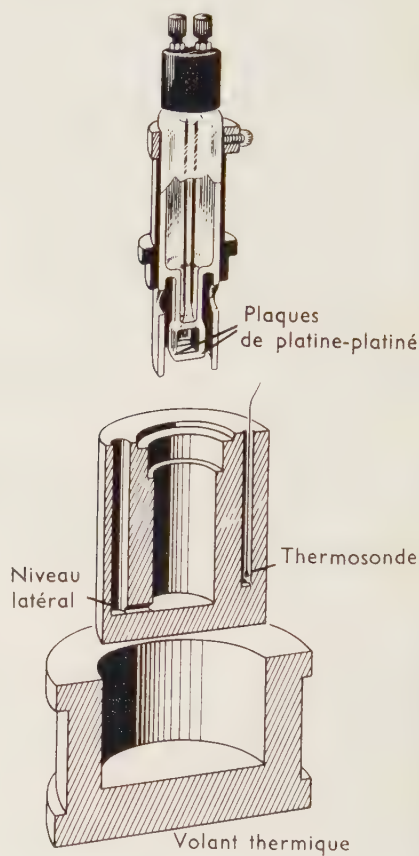


Figure 57. Vue éclatée détaillée

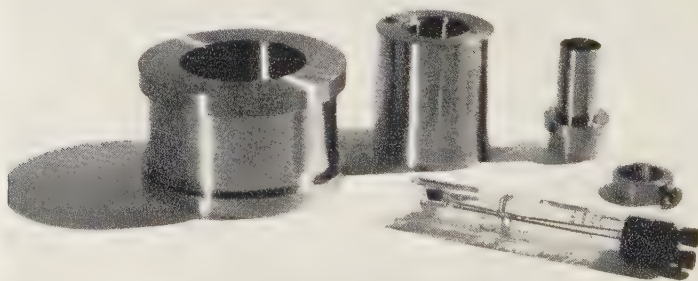


Figure 56. Les diverses pièces de la cellule de mesure de résistivité

glycérol. Les mesures ont été effectuées en courant alternatif basse fréquence, à 1 000 cycles/seconde, sous une tension de 4 volts efficaces, et elles ont porté sur des valeurs de la résistivité comprises entre 1 ohm/cm et $2 \cdot 10^7$ ohms/cm. Par suite des très grandes variations de la résistance en fonction de la température, nous avons choisi pour la représenter graphiquement, le logarithme de la résistivité.

II. Résultats expérimentaux

La manière dont se développent les cristaux de glace au sein d'une solution saline conduit, comme nous l'avons vu, à l'existence, entre les masses cristallines, d'espaces étroits contenant des liquides fortement salins. Il semble très logique de penser que ces veines liquides sont en continuité et qu'elles forment un réseau plus ou moins serré, autour des cristaux de glace.

Sloviter [187] a pu d'ailleurs montrer que des globules rouges, en présence de glycérol, étaient susceptibles de sédimenter à travers la masse compacte d'une solution physiologique congelée vers -10°C , ce qui prouve que le réseau interstitiel est continu.

Il est également raisonnable de penser que l'ensemble de ce réseau capillaire, qui contient un liquide fortement salin, est relativement perméable au courant électrique malgré l'étroitesse des veines liquides. C'est pourquoi, au cours de cette étude, nous avons admis qu'il existait toujours des phases liquides quand la résistivité était inférieure à 10^7 ohms/cm, et, réciproquement, que la solution pouvait être considérée comme totalement cristallisée lorsque sa résistivité n'était plus mesurable. Il convient de souligner, toutefois, que l'on doit attribuer à ce *passage de la résistance à l'infini*, une valeur exclusivement relative, et qu'il correspond en réalité, avec notre montage, à un accroissement de la valeur de la résistance tel que la résistivité dépasse $2 \cdot 10^7$ ohms/cm. Cependant, compte tenu des réserves que nous venons de faire, et pour faciliter l'exposé, nous dirons que la résistance devient alors infinie.

1. EAU DISTILLÉE (figure 58, E)

La glace en-dessous de 0°C est très peu conductrice et comme le montre la figure 58, la cristallisation est totale.

Les mélanges binaires, eau-glycérol, sont, quant à eux, légèrement conducteurs. Cela s'explique aisément, car, au cours du refroidissement, il existe une phase liquide faiblement conductrice, constituée par une solution concentrée de glycérol (figure 58, EG).

Variations de la résistivité ρ de solutions congelées en fonction de la température. Les courbes sont dressées en coordonnées logarithmiques

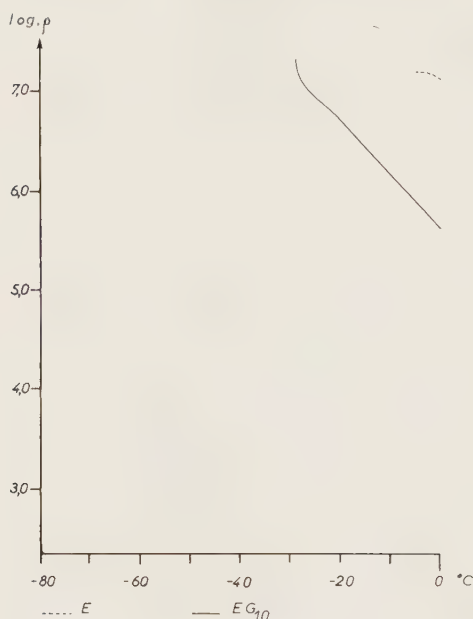


Figure 58

E : Eau distillée

EG₁₀ : Solution aqueuse de glycérol à 10 %

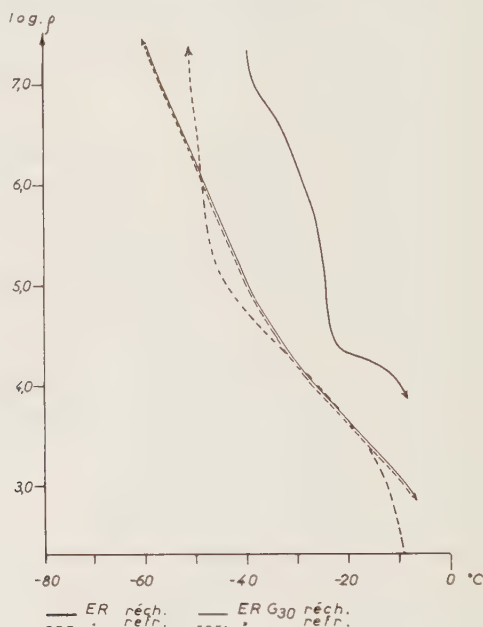


Figure 59

ER : Liquide d'Earle

réch. : variation de la résistivité ρ au cours du réchauffement

refr. : variation de la résistivité ρ au cours du refroidissement

ER G₃₀ : Liquide d'Earle + 30 % de glycérol

réch. : variation de la résistivité ρ au cours du réchauffement

refr. : variation de la résistivité ρ au cours du refroidissement

2. SOLUTIONS SALINES

Nous rompons ici, quelque peu, avec l'ordre d'exposition, pour décrire de façon détaillée, une expérience qui nous a servi à orienter notre travail.

Lorsque l'on refroidit une solution saline, comme le liquide d'Earle, de façon progressive, en ajoutant de la neige carbonique au bain réfrigérant, on constate que la résistivité augmente au fur et à mesure que la température décroît (figure 59, ER refr.). Cela peut s'interpréter par la diminution du calibre des espaces interstitiels, résultant de l'accroissement des cristaux de glace.

L'augmentation de la concentration qui en découle n'est alors pas suffisante pour compenser la diminution de la surface utile de passage du courant, et la résistance de l'ensemble du système s'accroît. Lorsque la température a atteint -45°C environ, la résistivité augmente très rapidement et elle cesse d'être mesurable vers -50°C . On peut supposer qu'alors, la cristallisation est complète. Si l'on réchauffe ensuite progressivement la solution ($0,5$ à $1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$) (ER réch.), les phases liquides n'apparaissent de nouveau que vers -40°C . Leur développement est assez rapide au début, puis il se stabilise vers -30°C . Cette expérience nous montre donc que les propriétés physiques d'une solution à basse température ne dépendent pas uniquement de la température, mais également, du traitement thermique auquel elle a été soumise.

Il semble, d'ailleurs, que la période critique soit principalement la phase de congélation. En effet, au cours d'expériences successives, les courbes correspondant au réchauffement se sont montrées superposables, tandis que les courbes tracées lors de la congélation manifestent de grandes divergences.

Il est curieux de constater, par contre, que l'addition de 30% de glycérol modifie totalement le phénomène. D'une part, la limite extrême de solidification se trouve repoussée aux environs de -60°C , et, d'autre part, le processus de cristallisation devient absolument réversible. Les courbes de résistivité, tracées lors de la congélation et lors du dégel, sont confondues, et, à tout moment, peuvent être écrites indifféremment dans un sens ou dans l'autre. Comme nous l'avions déjà constaté, le glycérol provoque un changement profond dans le comportement des solutions à basse température et il exerce un rôle à la fois modérateur et régulateur sur la cristallisation.

La solution physiologique d'Earle étant un liquide relativement complexe, nous avons voulu analyser les phénomènes qui viennent d'être décrits à l'aide de liquides plus simples.

A. Solution aqueuse de ClNa à 10% (figure 60, ClNa_1)

Les expériences réalisées avec la solution de ClNa , ont abouti exactement aux mêmes résultats, et, seules, les courbes tracées lors du réchauffement se sont avérées reproductibles.

Pour comprendre et expliquer ce comportement particulier, il faut revenir à la physique des solutions. Nous avons étudié précédemment, les phases initiales de la cristallisation d'une solution aqueuse à 10% de chlorure de sodium, et nous avons vu que la glace continuait à se former en-dessous de -20°C , bien que la majeure partie ait cristallisé entre -1°C et -10°C . Si l'on poursuit alors la réfrigération, le liquide interstitiel finit par cristalliser à la température de $-21,3^{\circ}\text{C}$, en donnant un mélange hétérogène de cristaux de glace pure et de cristaux du sel $\text{ClNa}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ également purs, soigneusement entremêlés. Il

Variation de la résistivité des solutions congelées en fonction de la température (suite)

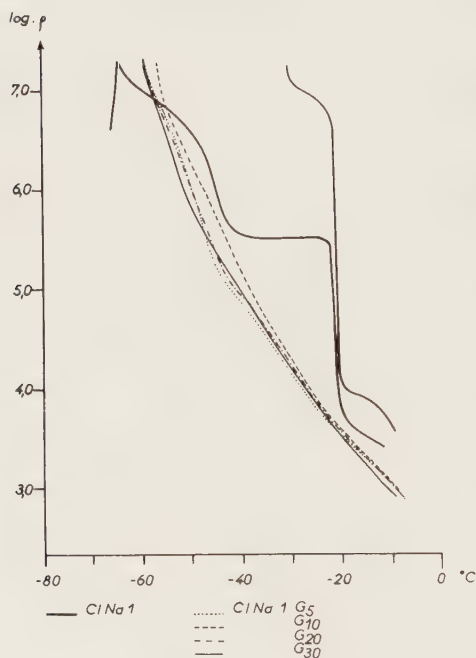


Figure 60

CI Na 1 : solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 ‰

CI Na 1 G₅ : solution aqueuse de chlorure de sodium 10 ‰ + 5 ‰ glycérol

CI Na 1 G₁₀ : solution aqueuse de chlorure de sodium 10 ‰ + 10 ‰ glycérol

CI Na 1 G₂₀ : solution aqueuse de chlorure de sodium 10 ‰ + 20 ‰ glycérol

CI Na 1 G₃₀ : solution aqueuse de chlorure de sodium 10 ‰ + 30 ‰ glycérol

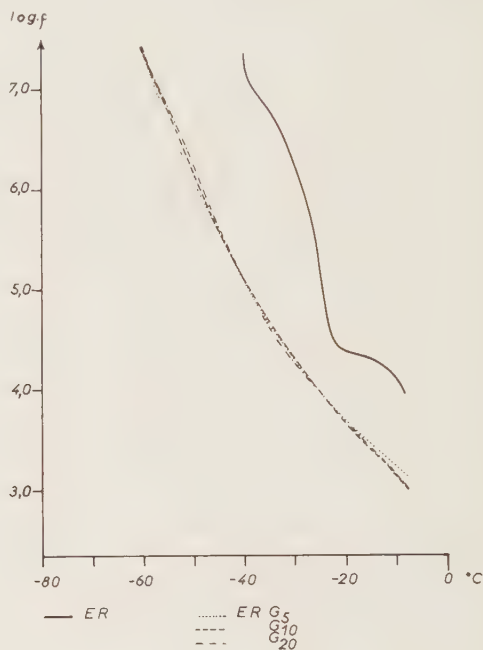


Figure 63

ER : liquide d'Earle

ER G₅ : liquide d'Earle + 5 ‰ de glycérol

ER G₁₀ : liquide d'Earle + 10 ‰ de glycérol

ER G₂₀ : liquide d'Earle + 20 ‰ de glycérol

s'agit là d'un mélange solide appelé eutectique et la température de $-21,3^{\circ}\text{C}$ représente la température eutectique ou point d'eutexie. Elle est définie sur le diagramme thermodynamique par l'intersection de la courbe de solubilité et de la courbe cryométrique. L'eutectique a ainsi une composition fixe, qui correspond à 30,7 ‰ de sel anhydre. Une solution aqueuse de chlorure de sodium à 30,7 ‰ donne donc directement l'eutectique par cristallisation, sans apparition préalable de glace, et, de ce fait, se comporte comme un corps pur, dont l'existence est virtuelle. En réalité, la solidification et la fusion ne sont pas des processus

simples, mais résultent d'une solidification et d'une fusion simultanées de la glace et du sel.

Les solutions aqueuses, qui sont plus riches en eau, laissent toujours, au contraire, déposer d'abord de la glace. Pour généraliser le problème, on peut d'ailleurs constater avec Vuillard [209], que, lorsque l'on examine les diagrammes d'équilibre solide $\rightleftharpoons$ liquide des systèmes binaires renfermant de l'eau, la branche de glace aboutit toujours à un point d'eutexie et que, pour toutes les solutions diluées, on arrive à un mélange en proportions variables de glace et d'eutectique.

Dans le cas du chlorure de sodium, lorsque la solution aqueuse à 10⁰/₀₀ devient totalement cristalline, elle est constituée par des cristaux de glace, séparés par des espaces interstitiels remplis du mélange eutectique. La cristallisation doit, d'ailleurs, être totale lorsque la température a atteint le point d'eutexie, et, inversement, la fusion débute dès qu'elle le dépasse. La première phase qui disparaît alors, est le mélange eutectique, puis la glace fond progressivement.

Comment expliquer que la résistance infinie ne soit atteinte que pour des températures beaucoup plus basses que $-21,3^{\circ}\text{C}$? Il s'agit là, cependant, d'un fait expérimental indiscutable et nous avons pu garder pendant plusieurs heures la solution à la température de -25°C sans que la résistance devienne infinie.

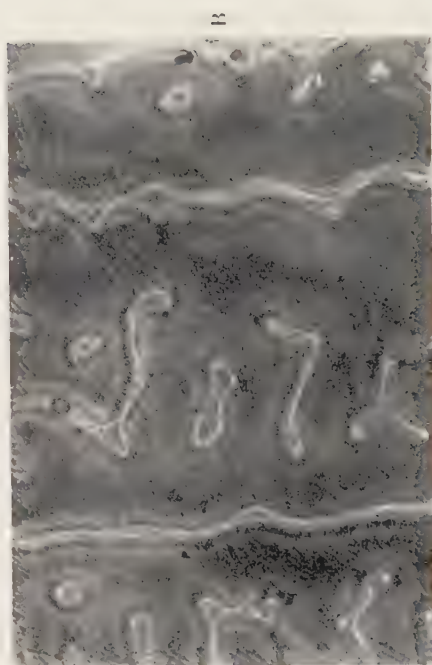
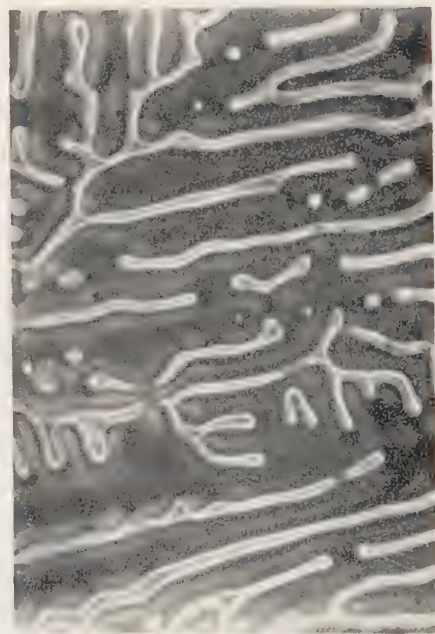
Nous avons la certitude que seule la surfusion de l'eutectique peut expliquer ce phénomène. Nous l'avons d'ailleurs vérifié par l'observation microscopique (figure 61 a et b, figure 62 a et b). L'eutectique peut ne pas cristalliser et rester en surfusion jusque vers -40°C . Par contre, la fusion a toujours lieu très exactement à $-21,3^{\circ}\text{C}$, et cela permet d'interpréter nos courbes de réchauffement qui marquent une brusque discontinuité pour $-21,3^{\circ}\text{C}$.

Il est certainement très difficile de comprendre comment une solution sous-refroidie qui doit cristalliser en donnant des cristaux de glace et des cristaux de $\text{ClNa}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peut rester en surfusion au contact de cristaux de glace. Nous n'avons, d'ailleurs, pas pu en trouver d'explication satisfaisante. Par contre nous avons pu en tirer deux conclusions principales sur le plan pratique :

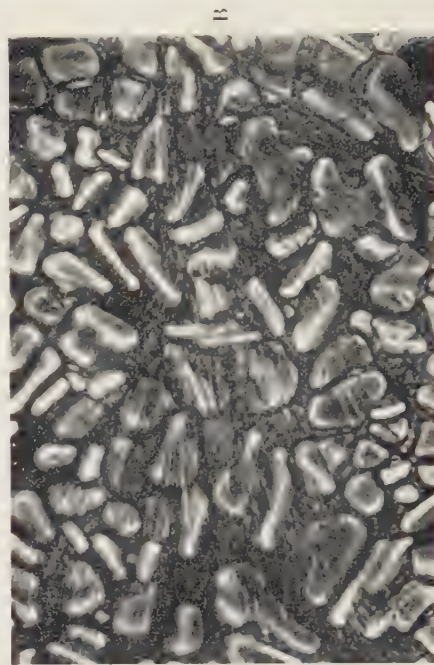
Il est nécessaire de refroidir les solutions à des températures très inférieures au point d'eutexie, pour être assuré que la cristallisation est totale. Il faut donc soumettre la solution étudiée à une véritable *trempe*, au sens métallurgique du terme. Nous l'avons réalisée pratiquement en immergeant directement notre cellule d'examen dans un mélange neige carbonique-alcool, vers -75°C et en laissant l'équilibre se faire en une ou deux heures. Pour effectuer les mesures, on réchauffe alors progressivement la solution.

Seules, les courbes obtenues au cours du réchauffement progressif qui suit la

Etude de la cristallisation des mélanges eutectiques à l'aide du microscope à réfrigération

Figure 61. Solution aqueuse à 100 ‰ de ClNa. Contraste de phase $\times 560$.

- a) cristallisation initiale de l'eau. On aperçoit entre les cristaux de glace, les veines liquides contenant une solution très riche en sel. Une mince couche liquide enveloppe également les cristaux sur leurs face, antérieures et postérieures. Température — 22°C
 b) le mélange eutectique a cristallisé. Température — 21°C

Figure 62. Solution aqueuse à 200 ‰ de ClNa. Contraste de phase $\times 560$.

- a) cristallisation initiale de l'eau. Par suite de la teneur élevée en sel, une faible quantité de glace pure cristallise.
 b) le mélange eutectique a cristallisé. Température — 210°C

période d'équilibrage, peuvent être interprétées et donner des résultats reproductibles.

L'étude de la solution aqueuse de chlorure de sodium contenant du glycérol, montre des phénomènes identiques à ceux que nous avons décrits à propos de la solution d'Earle, et ils s'accompagnent d'une disparition totale du phénomène d'eutexie due au sel. Nous avons pu, en outre, constater que le pourcentage de glycérol n'intervenait pas de façon sensible (figure 60).

B. Solution physiologique d'Earle (figure 63, ER)

Nous ne reviendrons pas sur ce que nous avons déjà dit à son sujet, mais nous envisagerons deux nouveaux aspects du problème. D'une part, nous pouvons constater qu'il n'y a pas ici, lors du réchauffement, de discontinuité brutale dans la courbe de variation de la résistance. Il n'existe pas, à proprement parler, de point d'eutexie bien défini, mais plutôt un domaine eutectique largement étalé entre -38°C et -22°C . Cela s'explique facilement si l'on constate que la solution physiologique d'Earle n'est pas un liquide simple, et que les phénomènes d'équilibre correspondant aux divers sels s'ajoutent et aboutissent ainsi à la constitution de mélanges eutectiques complexes. Cependant, ces mélanges qui nous sont inconnus, manifestent le même phénomène de retard à la cristallisation et, comme ils doivent contenir des cristaux de glace, il faudrait pouvoir expliquer cette surfusion anormale.

L'addition de glycérol, d'autre part, montre que sa concentration n'intervient pas. On peut également remarquer, que la courbe correspondant aux mélanges liquide d'Earle - glycérol, est presque identique à la courbe ClNa aqueux à 10 % - glycérol. Il semble donc que l'aspect et le déroulement des divers phénomènes de cristallisation, dépendent surtout du glycérol lui-même. Il s'agit là de l'un des points les plus importants de l'action du glycérol et nous l'analyserons de façon plus précise ultérieurement.

C. Foie de Veau (figures 64 et 65)

Lorsque l'on étudie un système beaucoup plus complexe encore, comme un tissu entier, il n'est pas étonnant de constater que les frontières eutectiques deviennent très frustres. Cela résulte directement du haut degré de complexité structurale du tissu. Il est néanmoins possible de recueillir des informations intéressantes. Tout d'abord, le même phénomène de surfusion se retrouve et, seules, les courbes de réchauffement sont significatives. On constate ensuite que la limite inférieure des eutectiques semble voisine de -40°C environ, pour le foie entier, et -45°C , -50°C , pour le foie broyé. Ce résultat est tout à fait vraisemblable si l'on remarque que le broyage, libérant de nombreuses substances dans le milieu, en accroît encore la complexité et recule par conséquent la fron-

Variation de la résistivité des solutions congelées en fonction de la température (suite)

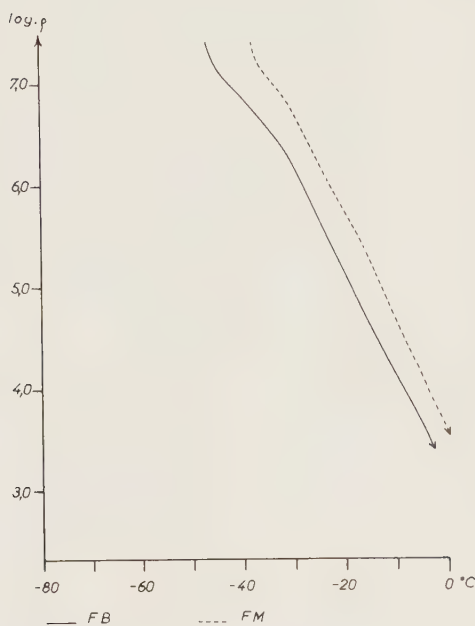


Figure 64

FB : broyat de foie de veau
FM : foie de veau en morceaux



Figure 65

FM G₃₀ : foie de veau en morceaux, imprégné par du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol
FM G₆₀ : foie de veau en morceaux, imprégné par du liquide d'Earle contenant 60 % de glycérol

tière d'eutexie. Enfin, quant à l'action du glycérol, on retrouve pour les tissus entiers, les deux mêmes phénomènes qui ont été mis en évidence précédemment. D'une part, le processus de cristallisation devient réversible, et, d'autre part, le passage à la résistance infinie a lieu à une température beaucoup plus basse et voisine de -60°C . Ici encore, la courbe résultante (FMG 30) n'est guère différente de celles qui ont été obtenues pour la solution aqueuse de ClNa et le liquide d'Earle additionnés de glycérol. L'influence prédominante du glycérol semble donc être démontrée. Il ne semble pas que la concentration du glycérol soit un facteur très important. Il convient, cependant, de noter que, pour les très hautes concentrations (60 %), l'aspect de la courbe est quelque peu différent dans la région 0° - -25°C , ce qui s'explique aisément par la faible conductivité du glycérol.

Conclusion

L'étude expérimentale du passage des températures intermédiaires, souligne le rôle majeur des phénomènes d'eutexie. Il faut, en effet, en tenir compte si l'on désire éviter les actions toxiques des solutions salines concentrées, formées au cours du refroidissement, et si l'on veut amener tout le matériel à l'état solide. La méthode électrique nous a montré combien le processus de cristallisation était irrégulier par suite des phénomènes de surfusion. Il semble, à ce sujet, que, seule, une *trempe* de la solution à une température au moins égale à -70°C , puisse donner l'assurance que tout est cristallin. L'analyse des courbes de résistivité nous a également montré, pour des tissus entiers, que, lors du réchauffement, la frontière eutectique pouvait se trouver vers -50°C . La conservation de longue durée d'un tissu ne peut donc s'envisager à une température supérieure à -50°C .

D'autre part, il a été possible de préciser le rôle du glycérol. L'addition de glycérol a pour effet principal de régulariser l'ensemble du processus de cristallisation, en supprimant les phénomènes eutectiques dus aux mélanges salins, et en le rendant réversible. De plus, l'addition de glycérol repousse les frontières de la zone d'eutexie vers -60°C , et cela recule encore la température maxima de conservation. Le glycérol semble donc avoir, à l'intérieur de la zone de températures intermédiaires, un rôle dominant, et il impose, en quelque sorte, son propre comportement aux systèmes qu'il imprègne.

L'étude de la cristallisation des mélanges eutectiques nous a conduit vers des températures voisines de -80°C , et nous avons vu qu'à partir de cette limite, l'ensemble des systèmes biologiques que nous avons considérés, se présentait à l'état solide. Il ne semble donc pas qu'ils soient susceptibles d'évoluer au cours d'un refroidissement ultérieur. Toutefois, il nous reste encore plus de 100°C à parcourir pour atteindre la température de l'azote liquide, et nous devons envisager l'évolution des tissus à l'intérieur de cette zone de température. Nous verrons ainsi que, contrairement aux apparences, il se produit des transformations considérables, de véritables réactions en milieu solide, qui peuvent avoir des répercussions très importantes dans le domaine de la conservation de la vie par les basses températures.

Phénomènes thermodynamiques à basse température. Transformation vitreuse et dévitrification

Pour étudier l'évolution d'un système biologique congelé entre -196°C et -80°C , il faut recourir à des méthodes indirectes. En effet, l'observation directe ne peut pas déceler les modifications de structure qui se produisent à basse température, car, le plus souvent, elles se font de manière très progressive et ne se traduisent qu'à l'échelle moléculaire, sans qu'il soit même possible d'apercevoir de très faibles changements morphologiques. Les propriétés thermodynamiques de la substance, par contre, peuvent subir des variations énormes, aussi avons-nous fait appel, pour ces recherches, à la méthode d'analyse thermique.

I. La méthode d'analyse thermique

Le principe de la méthode d'analyse thermique consiste essentiellement à suivre l'évolution de la température en fonction du temps à l'intérieur du système étudié. C'est ce que l'on appelle l'analyse thermique directe. Elle peut être effectuée, soit au cours du refroidissement, soit pendant la période d'échauffement. Les divers phénomènes thermodynamiques se traduisent alors, sur la courbe de température, sous la forme d'accidents caractéristiques, mais qui sont toutefois très discrets, puisque nous avons eu généralement affaire à des solutions diluées.

Nous avons vu, de plus, au cours de l'étude de la cristallisation des mélanges eutectiques, que, par suite de phénomènes de retard à la cristallisation, il était difficile d'étudier les solutions lors du refroidissement. C'est pourquoi nous avons principalement utilisé l'analyse thermique différentielle de systèmes biologiques, préalablement *trempés* dans l'azote liquide, et réchauffés progressivement.

L'analyse thermique différentielle par courbes d'échauffement, qui consiste

à étudier la variation de température entre le système étudié et une solution de référence placée dans des conditions identiques, constitue, en effet, une méthode beaucoup plus sensible et son interprétation est plus aisée. Nous avons mis au point une technique très voisine de celle décrite par Vuillard [209] et nous avons réalisé, pour cela, un montage expérimental spécial dont le figure 66 donne un schéma d'ensemble.

1. SCHÉMA DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL (figure 66)

Le système étudié et la solution de référence sont contenus dans une cellule métallique spéciale qui est préalablement refroidie par immersion dans l'azote liquide, puis transférée dans un cryostat où on laisse le réchauffement se produire spontanément. Dans certains cas, le cryostat a été rempli de propane liquide ou d'isopentane, et le réchauffement contrôlé par une résistance chauffante. Un enregistreur automatique de température permet de relever graphiquement les températures suivantes : cellule métallique : partie périphérique ; cellule métal-

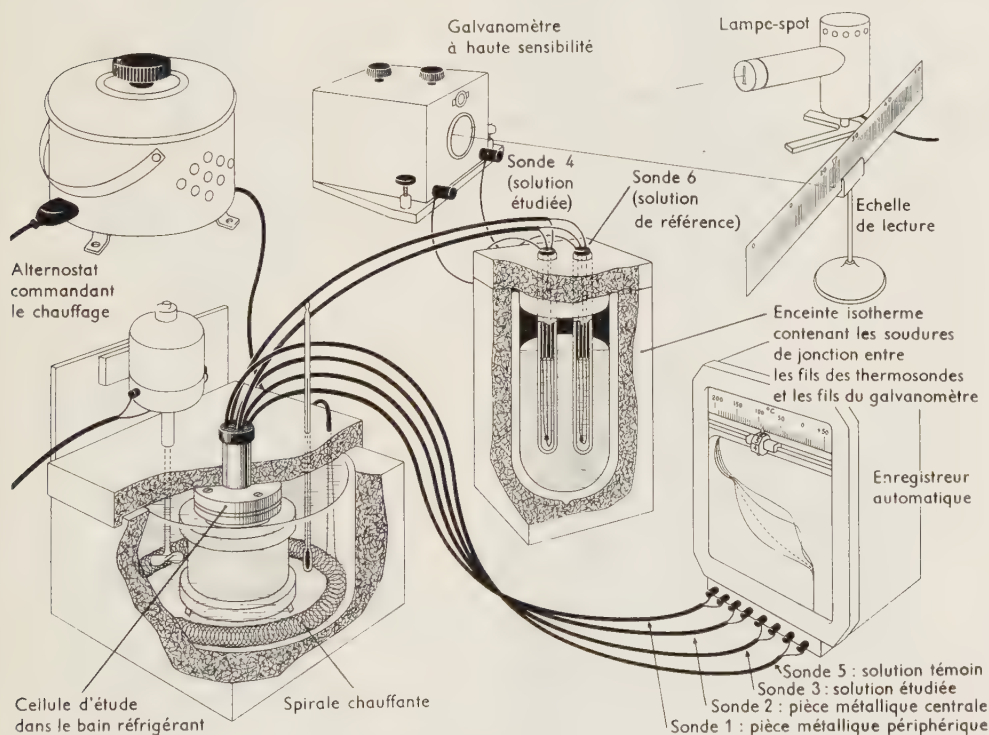


Figure 66. Montage utilisé pour l'analyse thermique directe et différentielle de solutions congelées.

lique : partie centrale : système étudié : solution de référence. Les courbes correspondantes permettent donc d'effectuer une analyse thermique directe.

On mesure, d'autre part, la différence de température entre le système étudié et la solution de référence à l'aide d'un galvanomètre à très haute sensibilité. Les lectures se font, soit directement sur une échelle transparente, soit par l'intermédiaire d'un enregistreur automatique du type *suiveur de spot*. La sensibilité la plus grande permet d'apprécier $0,004^{\circ}\text{C}$.

2. CELLULE D'ÉTUDE (figures 67 et 68)

La cellule d'étude que nous avons réalisée est représentée sur les figures 67 et 68. Elle consiste en un ensemble de trois pièces métalliques en acier inoxydable,



Figure 67. Cellule d'étude utilisée pour l'analyse thermique

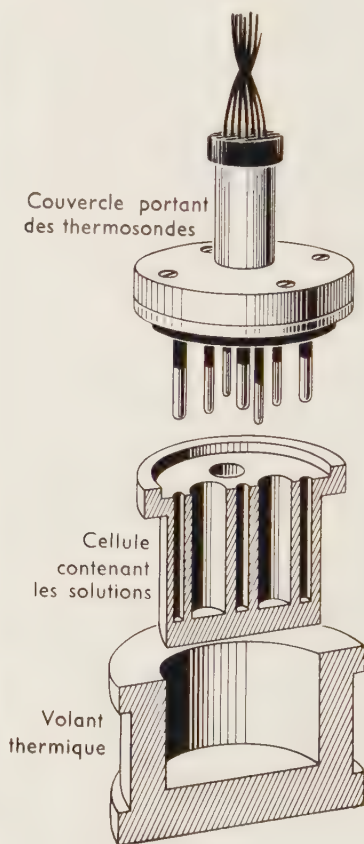


Figure 68.
Vue éclatée de la cellule d'étude

dont l'ajustage est très étroit. La cellule proprement dite est un cylindre d'acier percé de 4 cavités en croix, de 10 cm³ de capacité, et qui reçoivent 5 cm³ de solution. Deux d'entre elles contiennent le système étudié, et les deux autres, la solution de référence. L'ensemble est réparti de telle manière que la solution étudiée et la solution de référence soient diamétralement opposées. Trois trous profonds et étroits, permettent de connaître la température de la masse métallique en son centre et à la périphérie.

La cellule peut recevoir un couvercle portant 7 thermocouples, dont 4 pénètrent au centre des cavités, et 3 à l'intérieur de la masse métallique. La position de ce couvercle est bien définie, puisqu'il est guidé par les thermocouples s'enfonçant dans la masse métallique. Les sondes thermoélectriques, placées dans les cavités, occupent toutes la même position, équidistante des parois et du fond de la cavité, et à mi-hauteur de la solution. Un volant thermique épais peut, enfin, s'adapter sur la partie externe de la cellule. L'ensemble de la cellule d'étude présente donc une symétrie axiale parfaite, ce qui permet une très grande précision de mesure dans l'analyse thermique différentielle.

3. PRINCIPE DE LA MESURE

A. Techniques

a) *Analyses thermiques de — 80° C à 0° C.* La cellule d'examen est immergée brusquement dans un bain neige carbonique - alcool, à — 75° C environ. Le refroidissement est alors assez rapide, et la température qui diminue de façon exponentielle atteint — 50° C en 11 minutes. On attend une heure pour que l'équilibre soit réalisé, puis on effectue le réchauffement. Si l'on désire qu'il soit très lent, on ajoute le volant thermique à — 75° C après l'avoir préalablement refroidi séparément.

b) *Analyses thermiques de — 196° C à 0° C.* La cellule d'examen est immergée dans l'azote liquide dont on maintient le niveau constant. La courbe de refroidissement (figure 69) présente une allure exponentielle jusque vers — 130° C environ. Il se produit alors, un abaissement brutal de la température qui s'accompagne d'une violente ébullition de l'azote liquide. En effet, à — 130, — 150° C, le phénomène de caléfaction cesse et l'azote liquide mouille la surface métallique, provoquant ainsi une chute thermique brutale, suivie d'une diminution exponentielle de la température. La réfrigération est rapide dans l'ensemble.

Dans certains cas où nous avons voulu obtenir des vitesses de refroidissement plus élevées, nous avons utilisé le propane liquide à — 196° C (figure 74). La fin du refroidissement, à partir de — 150° C toutefois, a toujours été réalisée avec de l'azote liquide.

Courbes de refroidissement de la cellule d'étude employée pour les analyses thermiques (enregistrement électrique).
 En pointillé : température de la masse métallique (sonde périphérique). En trait plein : température d'une solution
 étudiée (ClNa 1 G₃₀)

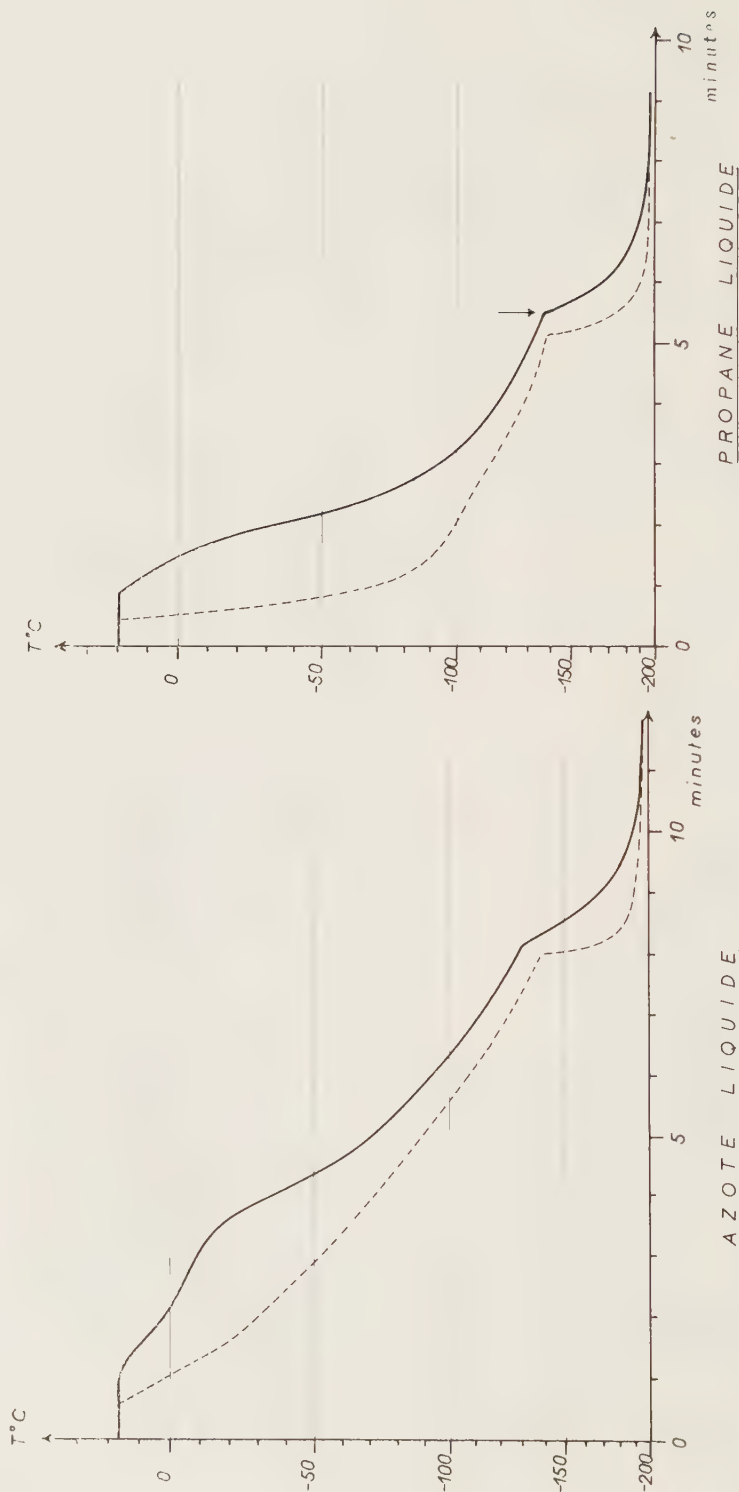


Figure 64. Refroidissement dans l'azote liquide. Noter l'abaissement brutal de température au-dessous de -140°C . consécutif au phénomène de *mouillage*

Figure 74. Refroidissement dans le propane liquide à -190°C . Lorsque la température atteint -140°C , la cellule est immergée dans l'azote liquide (temps indiqué par la flèche)

Les principaux résultats numériques sont réunis dans le tableau ci-dessous. Ils correspondent à une solution aqueuse à 10 ‰ de ClNa, additionnée de 30 ‰ de glycérol.

	<i>Durée totale du refroidissement mn</i>	<i>Vitesse moyenne de +20°C à -150°C</i>	<i>Vitesse moyenne de -150° à -196°C</i>
--	---	--	--

AZOTE LIQUIDE

Bloc métallique (sonde périphérique)	10	0,30° C/s	0,80° C/s
Solution étudiée ClNa ₁ G ₃₀	11	0,33° C/s	0,45° C/s

PROPANE LIQUIDE

Bloc métallique (sonde périphérique)	6	0,72° C/s	0,80° C/s
Solution étudiée ClNa ₁ G ₃₀	8	0,75° C/s	0,50° C/s

B. Solutions de référence

La solution de référence ne doit pas être quelconque. En effet, il convient de choisir un corps qui se rapproche le plus possible du système étudié, et qui n'évolue pas au cours du réchauffement. Nous avons utilisé l'eau distillée : par suite du refroidissement relativement lent, l'eau se présente entièrement sous forme de glace qui ne manifeste aucune transformation pendant la période d'analyse. Nous l'avons d'ailleurs vérifié, en prenant comme témoin, la masse métallique elle-même.

II. Etude expérimentale des transformations de certains systèmes biologiques à basse température

Avant d'aborder l'étude des transformations à très basse température, nous avons voulu vérifier, par analyse thermique, les résultats que la méthode électrique nous avait donnés sur les phénomènes eutectiques.

I. APPLICATION DE L'ANALYSE THERMIQUE A L'ÉVOLUTION DES MÉLANGES EUTECTIQUES

Nous avons étudié les phénomènes eutectiques à l'intérieur de quelques systèmes biologiques, en commençant par des solutions salines simples. Les analyses thermiques correspondantes ont été effectuées à partir de - 80° C.

4. Solution aqueuse à 10 ‰ de ClNa (figures 70 et 71, ClNa)

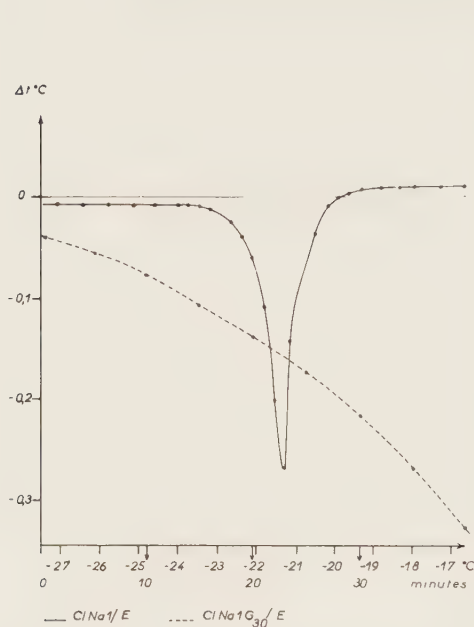


Figure 70

ClNa 1/E : solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 ‰. Solution de référence : eau distillée.

ClNa 1G₃₀/E : solution aqueuse de chlorure de sodium à 10 ‰ + 30 % de glycérol. Solution de référence : eau distillée.

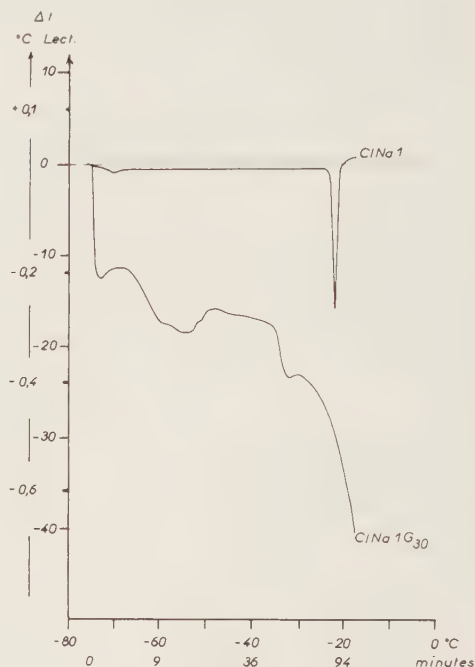


Figure 71

ClNa 1 : solution aqueuse de ClNa à 10 ‰. Solution de référence : eau distillée.

ClNa 1G₃₀ : solution aqueuse de ClNa à 10 ‰ + 30 % de glycérol. Solution de référence : eau distillée.

La fusion du mélange eutectique lors du réchauffement est mise en évidence de manière frappante à la température de $-21,3^{\circ}\text{C}$. Ceci confirme donc nos observations précédentes. L'effet thermique est d'ailleurs d'autant plus prononcé que la teneur en sel est plus élevée. La température d'eutxie, par contre, reste constante, tandis que la durée du phénomène d'invariance augmente, comme le montre le tableau suivant.

Solution ‰	Température d'eutxie	Durée du phénomène d'invariance mn
ClNa 10	$-21,3^{\circ}\text{C}$	0,5
— 100	—	5
— 200	—	12,5
— 300	—	17,5

Cela s'explique aisément si l'on considère que la proportion de mélange eutectique augmente avec la concentration saline, comme le montrent les figures 61 et 62.

L'addition de glycérol provoque une disparition du phénomène d'eutexie dû au chlorure de sodium.

La fusion de la solution débute à une température plus basse, entre -60°C et -50°C . Elle est d'ailleurs précédée par une série d'accidents thermiques dont l'interprétation est très difficile, mais qui doivent correspondre à la fusion de l'eutectique (glycérol - ClNa - H_2O) ainsi qu'à des phénomènes de recristallisation partielle (figure 71). A partir de -40°C , la fusion est régulière et la glace disparaît alors progressivement (figure 70), ce qui est en accord avec les résultats donnés par les mesures de résistivité.

B. Solution physiologique d'Earle (figure 72, ER)

Le diagramme thermique obtenu avec la solution physiologique d'Earle, montre que le phénomène thermique commence vers -40°C , et qu'il atteint son maximum pour $-22,8^{\circ}\text{C}$ environ. Nous avons voulu voir dans quelle mesure les divers sels présents dans le liquide d'Earle contribuaient à la fusion eutectique. Pour cela, nous avons analysé la solution physiologique complète, en utilisant comme liquide de référence, des solutions aqueuses des divers sels aux mêmes concentrations que celles qu'ils occupent dans la formule d'Earle (figure 72). Nous avons pu constater, tout d'abord, que l'addition des divers sels modifient complètement le diagramme normal dû au chlorure de sodium ($\text{ER}/\text{ClNa}_{0,68}$). Nous avons trouvé ensuite, que l'ensemble des chlorures présents dans le liquide d'Earle (ClNa , ClK , Cl_2Ca) donnait un diagramme très voisin de celui du liquide d'Earle complet, et totalement différent de celui du ClNa seul (SCI/E , $\text{SCI}/\text{ClNa}_{0,68}$). Quant à l'addition des autres sels, si elle ne modifie pas beaucoup la forme de la courbe, elle provoque cependant un léger déplacement de la température correspondant au maximum d'effet thermique qui passe alors de $-22,2^{\circ}\text{C}$ à $-22,8^{\circ}\text{C}$.

C. Foie de veau entier (figure 73, FM)

L'analyse du foie de veau entier ne nous a pas fourni d'éléments très caractéristiques. Le diagramme est d'aspect confus et il indique simplement que les phénomènes de fusion commencent à basse température.

Par contre, l'analyse d'un foie préalablement imprégné par 30 % de glycérol (24 heures à $+2^{\circ}\text{C}$), donne un résultat très intéressant. Elle est, en effet, très semblable à celle que l'on obtient avec une solution aqueuse à 10 % de chlorure de sodium, contenant 30 % de glycérol. Ceci souligne donc très nettement, l'importance majeure de l'addition de glycérol sur l'évolution des

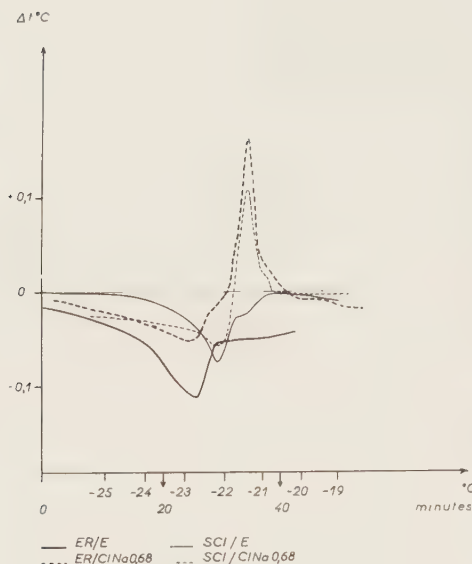


Figure 72

Analyse du liquide d'Earle

ER/E : liquide d'Earle. Solution de référence : eau distillée

ER/CINa 0,68 : liquide d'Earle. Solution de référence : solution aqueuse de chlorure de sodium à 6,8 ‰

SCI/E : solution contenant seulement les chlorures présents dans le liquide d'Earle. Solution de référence : eau distillée

SCI/CINa 0,68 : solution contenant seulement les chlorures présents dans le liquide d'Earle. Solution de référence : solution aqueuse de CINa à 6,8 ‰

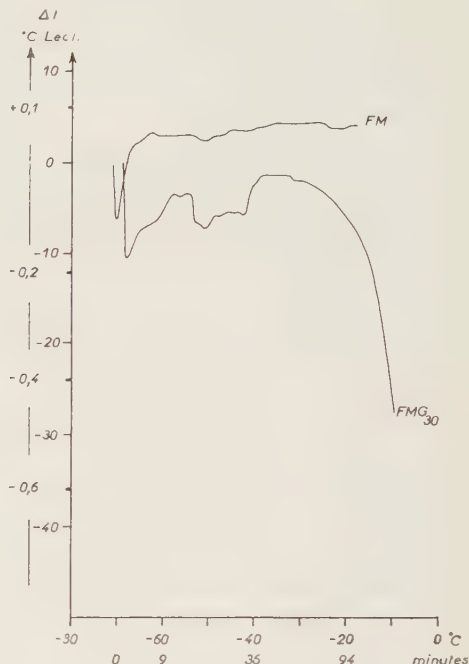


Figure 73

FM : foie de veau en morceaux. Solution de référence : eau distillée

FMG₃₀ : foie de veau en morceaux, préalablement imprégné par du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol. Solution de référence : eau distillée

tissus à basse température, et indique que son comportement personnel, à froid, joue un rôle dominant.

L'étude des phénomènes thermiques à très basse température, que nous allons entreprendre maintenant, ne fera que renforcer cette conviction.

2. LES PHÉNOMÈNES DE TRANSFORMATION ET DE CRISTALLISATION

A BASSE TEMPÉRATURE

Au cours de cette série expérimentale, nous avons envisagé diverses solutions biologiques et plus particulièrement celles qui contenaient du glycérol. Dans tous les cas, le refroidissement initial a été fait dans l'azote liquide, et, durant la période d'analyse, on a laissé la cellule se réchauffer spontanément à l'intérieur d'une enceinte isotherme.

A. Mélanges eau distillée-glycérol (figure 75, EG)

Comme nous l'avons dit précédemment, l'eau distillée seule ne montre pas d'effets thermiques entre -196°C et 0°C . Par contre, les mélanges d'eau et de glycérol donnent un diagramme caractéristique dont la forme dépend de la concentration en glycérol. Nous envisagerons les principaux cas :

a) *Solutions aqueuses contenant de 0 à 40 % de glycérol.* La courbe thermique présente de -196°C à -80°C , les particularités suivantes : — Un premier minimum (1) qui provient de la différence de conductivité thermique existant entre l'eau distillée pure de la cellule de référence, et le mélange eau distillée-glycérol de la solution étudiée. La glace pure est, en effet, meilleure conductrice de la chaleur que la glace-glycérol, et se réchauffe plus vite. — Un accident très léger (2) situé généralement entre -160°C et -130°C et dont la position et l'amplitude sont très variables. A notre point de vue, il est dû à la faible proportion d'eau vitreuse contenue dans la solution, et il pourrait représenter un phénomène de transformation vitreuse suivi de cristallisation, un phénomène typique de transformation vitreuse attribuable au glycérol (3). Au cours de ce processus, le matériel vitreux, qui avait des propriétés proches de celles du solide cristallisé (Simon [185], Kauzmann [78]), évolue vers le liquide, tandis que sa chaleur spécifique augmente très rapidement. Bien que cette transformation ne soit pas réversible au sens thermo-dynamique du terme, elle se produit toujours dans le même intervalle de températures. Sur la courbe d'analyse thermique différentielle, on note un brusque décrochement qui admet en son centre un point d'inflexion. Il s'agit du « domaine de transformation vitreuse » situé de part et d'autre de la température de transformation vitreuse (Vuillard [209]) T_g . De chaque côté de ce domaine, la substance présente l'aspect d'un verre qui est rigide et voisin du cristal, en-dessous de T_g , et qui, au contraire, peut être considéré comme un liquide sous-refroidi au-dessus de T_g . Dans le cas du binaire eau-glycérol, T_g se situe vers -106°C .

b) *Solutions aqueuses contenant de 45 à 65 % de glycérol.* L'analyse thermique de ces solutions montre les trois phénomènes que nous venons de décrire. Toutefois, l'amplitude de la transformation vitreuse est plus grande. Il se présente en plus, des accidents nouveaux, et nous sommes forcés, pour les interpréter, d'envisager séparément la solution contenant 50 % de glycérol, et celle qui en renferme 60 %.

Solution aqueuse à 50 % de glycérol-EG₅₀. La transformation vitreuse est suivie presque instantanément d'un phénomène exothermique qui atteint son maximum pour -105°C . Il s'agit là vraisemblablement, d'un phénomène de dévitrification dû à la cristallisation d'une partie du verre qui subit la transformation vitreuse.

Nous avons déjà vu à quoi correspondait le phénomène de dévitrification. C'est une recristallisation, le plus souvent totale, de la substance vitreuse, à partir du réseau irrégulier de cristallites, lorsque les mouvements moléculaires deviennent plus faciles par suite de l'élévation de température. Cette évolution peut être très brutale ou, au contraire, progressive. Elle se produit en général dans une zone de températures bien définie, le domaine de cristallisation. Dans la plupart des cas, le domaine de cristallisation se situe entre le domaine de transformation vitreuse et les points eutectiques. Parfois, au contraire, il chevauche presque complètement le domaine de transformation vitreuse et, de ce fait, le verre cristallise au fur et à mesure qu'il se transforme. Les solutions aqueuses contenant 50 % de glycérol constituent un exemple intermédiaire où la dévitrification suit immédiatement la transformation.

En dehors de cet ensemble de phénomènes, on remarque, d'autre part, un léger dégagement de chaleur vers -88°C (5). Il semble, d'après Vuillard [210], que l'on puisse l'attribuer à la transformation exothermique en glace hexagonale, de la glace cubique formée au cours du refroidissement.

Solution aqueuse à 60 % de glycérol-EG 60. L'amplitude de la transformation vitreuse est ici très grande. Le processus de dévitrification est également beaucoup plus intense et son maximum se situe vers -65°C .

c) *Solutions aqueuses contenant de 65 à 100 % de glycérol.* Par comparaison avec les solutions précédentes, on peut souligner les trois points suivants : le minimum (1) dû à la différence de conductivité thermique se creuse considérablement ; l'effet secondaire (2) est relativement peu visible ; le phénomène de transformation vitreuse va en s'accroissant, tandis que la température de transformation vitreuse se déplace vers -80°C au fur et à mesure que le pourcentage de glycérol augmente, ainsi que l'indique le tableau ci-dessous :

% de glycérol	60	70	80	90	100
Tg : température de transforma- tion vitreuse	-112°C	-106°C	-100°C	-94°C	-87°C

Au-dessus de -65°C , il n'apparaît plus de phénomène de dévitrification. Si l'on envisage alors, l'ensemble des courbes eau-glycérol, on constate qu'elles mettent en évidence le comportement très particulier du glycérol. Ce dernier est en effet susceptible de donner, au cours d'un refroidissement assez lent, un verre caractéristique dont l'abondance dépend du pourcentage de glycérol. Pour les concentrations inférieures à 40 %, ce verre doit correspondre à une solution étendue de glycérol. Au-dessus de 65 %, il représente un mélange très riche en glycérol. On sait, en effet, qu'à partir de 65 % de glycérol, une solution aqueuse ne cristallise jamais, quel que soit le mode de refroidissement (Meryman[117]).

Diagramme d'analyse thermique différentielle de solutions refroidies jusqu'à la température de l'azote liquide (-196°C).

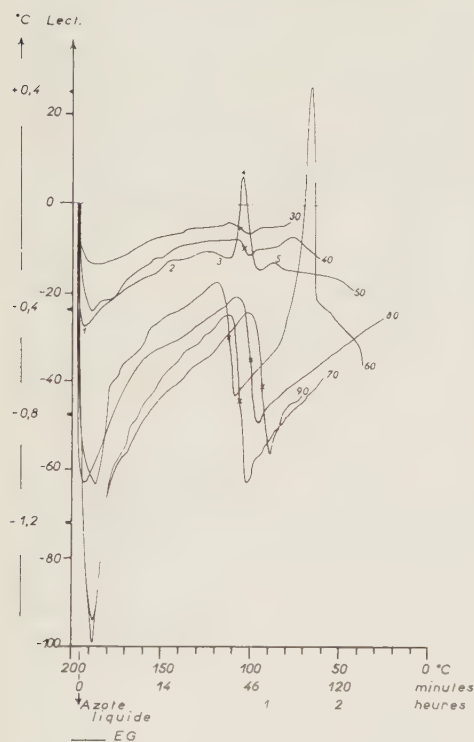


Figure 75

Mélanges eau distillée — glycérol. Le pourcentage de glycérol est porté sur la courbe

Mêmes systèmes de coordonnées que pour les figures 71 et 72. Les « accidents thermiques » sont repérés à l'aide de chiffres (1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6) identiques d'une figure à l'autre. Les explications correspondantes se trouvent dans le texte. Les croix marquées sur les courbes indiquent les températures de transformation vitreuse.

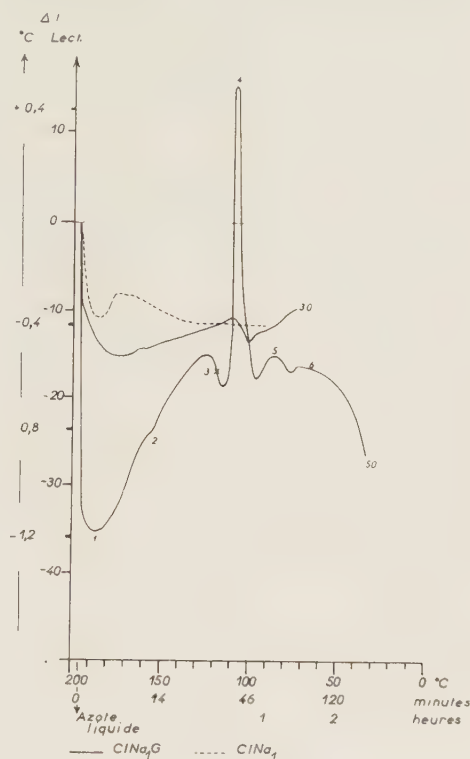


Figure 76

C1Na 1 : solution aqueuse à 10 ‰ de C1Na.

C1Na 1 G : solution aqueuse à 10 ‰ de C1Na + divers pourcentages de glycérol

Enfin, pour les concentrations comprises entre 45 et 65 ‰, le verre doit présenter une composition intermédiaire et doit donc être relativement riche en eau. Son état est alors instable et il cristallise au cours de la période d'échauffement. Il s'agit là d'un processus de dévitrification caractéristique tel que le conçoivent Luyet [104] et Vuillard [209]. Nous pensons, d'ailleurs, que le corps qui cristallise, correspond à un hydrate. Divers auteurs ont, en effet, montré que le glycérol pouvait former des hydrates (Séguir [183]). Dans nos expériences, le phénomène de cristallisation étant maximum aux environs de 60 ‰ de glycérol, on peut

supposer que cette concentration correspond précisément à la formule d'un hydrate particulier qui s'écrirait alors, $C_3H_8O_3, 2H_2O$. Ce composé ne se formerait pas dans les conditions usuelles, mais pourrait cristalliser par suite du traitement thermique. Cela est d'ailleurs très vraisemblable et il est en effet bien connu que la vitrification préalable, suivie de réchauffement progressif constitue un moyen commode de faire cristalliser des composés instables à la température ordinaire (Vuillard [209]).

L'analyse thermique du mélange binaire eau-glycérol, nous a donc montré l'importance des phénomènes thermodynamiques à basse température. Nous avons, d'ailleurs, de fortes raisons de penser qu'ils sont encore plus marqués sur des spécimens de plus petite taille. La proportion de matériel vitreux doit, en effet, y être plus élevée, par suite de la plus grande vitesse de refroidissement.

Quel est l'effet de l'addition de sels et de substances organiques sur ces divers phénomènes ? C'est ce que nous avons voulu étudier au cours d'une deuxième série d'expériences.

d) Mélanges solution aqueuse à 10⁰/₀₀ de ClNa-glycérol (figure 76, ClNa₁G) Le diagramme représentant la solution aqueuse de chlorure de sodium ne montre pas de très grands changements. On note, toutefois, l'existence d'un minimum initial dû à la différence de conductivité thermique, suivi par une zone de transformation qui s'étend largement de part et d'autre de la température de — 155° C. Il n'est pas impossible de penser qu'elle corresponde à la transformation vitreuse d'une partie de l'eau initiale, n'ayant pas cristallisé au cours du refroidissement.

En présence de glycérol :

30 % de glycérol. La courbe se rapproche beaucoup de celle de l'eau distillée contenant 30 % de glycérol. La transformation vitreuse est très bien visible et son intensité est supérieure à celle que l'on note avec de l'eau distillée seule. La température de transformation est de — 105° C et son amplitude maxima de l'ordre de 0,08° C.

50 % de glycérol. Pour cette concentration de glycérol, il est très intéressant de noter que la courbe obtenue est absolument identique à celle qui correspond au mélange eau distillée-glycérol à 50 %. On retrouve les cinq accidents que nous avons décrits : différence de conductivité (1) ; accident thermique vers — 155° C (2) ; transformation vitreuse à — 120° C (3) ; suivie d'un processus de dévitrification se traduisant par une cristallisation exothermique brusque qui atteint son maximum pour — 108° C (4), transformation exothermique de la glace cubique en glace hexagonale (— 87° C) (5). Le début de la fusion eutectique se manifeste ensuite (6). Dans l'ensemble, ces divers phénomènes sont plus intenses que pour le mélange binaire H₂O-glycérol. L'addition de chlorure de sodium ne

modifie donc pas l'essentiel du diagramme correspondant au binaire glycérol-eau.

e) *Mélanges solution physiologique d'Earle-glycérol* (figures 77 et 78, ERG). En l'absence de glycérol, le liquide d'Earle donne un diagramme confus et pratiquement impossible à interpréter. En présence de glycérol, nous retrouvons les phénomènes que nous venons de décrire pour les deux systèmes précédents. Nous les reprendrons brièvement : 30 % de glycérol : on note une faible transformation vitreuse ; 50 % de glycérol : la transformation vitreuse (3) est bien marquée et a lieu pour -119°C . Elle est suivie d'une cristallisation « explosive » (4) atteignant son maximum pour -107°C environ. On retrouve également les autres accidents thermiques : minimum dû à la différence de conductivité thermique (1) : accident vers -147°C (2) ; transformation de la glace cubique en glace hexagonale à -89°C (5) ; début de fusion (6). 60 % de glycérol : la transformation vitreuse est plus intense et se place à une température plus élevée (-112°C). La dévitrification se produit ensuite avec un maximum pour -60°C .

Dans l'ensemble, les mélanges solution d'Earle-glycérol, se comportent donc exactement comme le binaire eau-glycérol. Les phénomènes thermiques se présentent simplement avec une plus forte amplitude. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons réalisé l'expérience suivante, destinée à préciser les conditions de la dévitrification (figure 77).

Une solution d'Earle additionnée de 50 % de glycérol, est congelée dans l'azote liquide puis soumise à l'analyse thermique de -196°C à -80°C . La courbe (ERG₅₀) présente une transformation vitreuse vers -119°C , suivie d'un processus de dévitrification, maximum à -107°C . La solution est alors « recuite » à -78°C pendant 12 heures dans la neige carbonique, puis refroidie et analysée de nouveau de -196°C à -80°C . La nouvelle courbe (ERG₅₀) montre encore une transformation vitreuse située vers -102°C , mais beaucoup plus atténuée et qui n'est pas suivie de dévitrification. Ceci prouve qu'une partie seulement du glycérol a cristallisé en donnant l'hydrate, mais qu'il est demeuré une assez grosse quantité de la forme vitreuse. On peut raisonnablement penser qu'au bout de 12 heures, tout le verre qui pouvait se dévitrifier, est devenu cristallin. Il faut donc admettre qu'un certain pourcentage du glycérol initial reste vitreux et n'est pas susceptible de cristalliser.

Les expériences précédentes nous ont donc montré que, en présence de glycérol, les phénomènes thermodynamiques se produisant à basse température à l'intérieur des solutions salines étaient essentiellement ceux du glycérol lui-même. Dans quelle mesure cela est-il vrai pour des tissus entiers ? Nous avons cherché à y répondre au cours des expériences suivantes :

f) *Foie de veau imprégné par le glycérol* (figures 79 et 80, FMG). L'analyse thermique correspondant au tissu non imprégné ne donne pas beaucoup de rensei-

Diagrammes d'analyse thermique différentielle de solutions refroidies jusqu'à la température de l'azote liquide (suite).

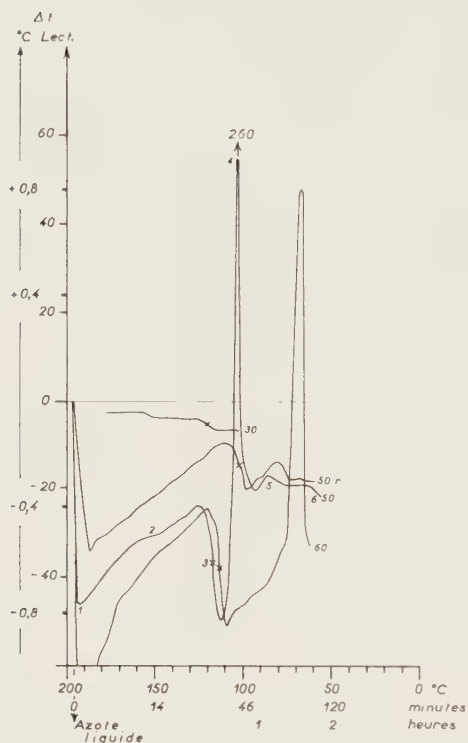


Figure 77

E R G : mélanges liquide d'Earle — glycérol.

E R G_{50r} : solution liquide d'Earle + 50 % de glycérol, refroidie à -196°C , réchauffée progressivement jusqu'à -80°C (1 h. 1/2), recuite 12 h à -80°C , puis refroidie de nouveau à -196°C et analysée ensuite par chauffage progressif jusqu'à la température de -60°C .

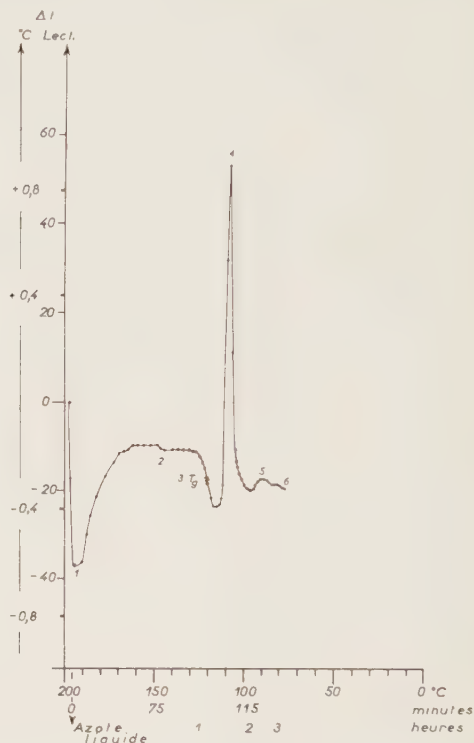


Figure 78

E R G₅₀ : liquide d'Earle + 50 % de glycérol

gnements et ne montre aucun des phénomènes précédents, à l'exception, peut-être, de la transformation de la glace cubique en glace hexagonale (5).

En présence de glycérol, par contre, on obtient des diagrammes que l'on peut rapprocher de ceux que nous venons d'analyser : 30 % de glycérol (figure 79) : à la suite des deux premiers accidents (1) et (2), qui sont légèrement marqués, on peut déceler une transformation vitreuse vers -105°C (FMG₃₀). 60 % de glycérol (figure 80) : la courbe obtenue (FMG₆₀), se rapproche considérablement

Diagrammes d'analyse thermique différentielle de solutions refroidies jusqu'à la température de l'azote liquide (suite).

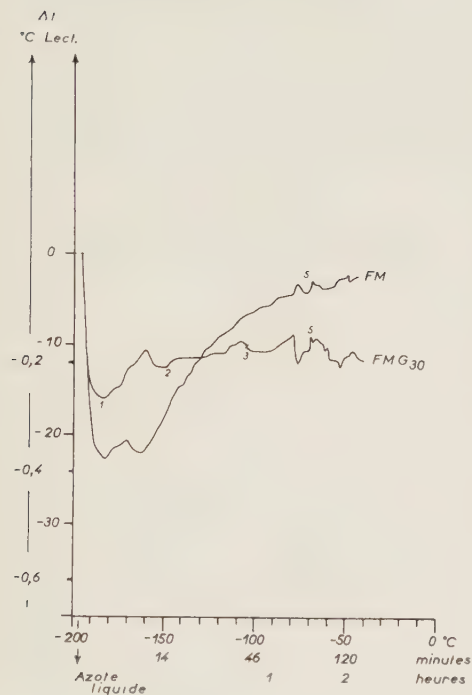


Figure 79



Figure 80

FM : foie de veau en morceaux
 FM G₃₀ : foie de veau en morceaux, préalablement imprégné par du liquide d'Earle contenant 30 % de glycérol

FM G₆₀ : foie de veau en morceaux, préalablement imprégné par du liquide d'Earle contenant 60 % de glycérol

de celles des solutions salines et l'on y retrouve tous les phénomènes que nous avons décrits. La transformation vitreuse, en particulier, a lieu vers -110°C et elle est suivie par une dévitrification maximum pour -89°C environ. Malgré quelques petites différences de températures, on peut affirmer que, après imprégnation préalable par du glycérol, le comportement thermodynamique d'un tissu animal entier à basse température, représente celui du glycérol seul.

Conclusion

Les expériences d'analyse thermique nous ont donc permis de préciser l'évolution des tissus au cours des dernières phases du refroidissement. Elles ont confirmé ce que nos recherches précédentes avaient déjà mis en valeur : l'influence déter-

minante du glycérol sur l'ensemble des propriétés physico-chimiques des tissus à basse température. L'existence, au-dessus de la température de -130°C , de phénomènes de transformation vitreuse, suivis de processus de dévitrification, parfois très violents, montre que si l'on veut soustraire un tissu, préalablement imprégné par du glycérol, à tout danger d'évolution possible, il faut le conserver à une température inférieure à -130°C . Parallèlement, nous avons pu voir que pour les hautes concentrations en glycérol, un réchauffement lent s'accompagnait toujours d'une cristallisation brutale. Il n'est pas impossible de penser qu'il s'agisse là d'un phénomène dangereux, susceptible de provoquer les plus graves altérations. Il semble d'ailleurs que nous en ayons eu la preuve expérimentale, car c'est la seule manière d'expliquer la mort des cœurs imprégnés par 60 % de glycérol, congelés dans l'azote liquide, puis réchauffés lentement de -196°C à -80°C avant un dégel final brutal (cf. p. 56).

Il est inutile alors de souligner avec quel soin devra être établie la technique de conservation d'un tissu par le froid. Les phénomènes d'eutexie et de dévitrification, en effet, peuvent provoquer des altérations énormes si la température est trop haute. Aussi, la seule méthode qui semble n'offrir aucun risque, consiste-t-elle à conserver le tissu à la température la plus basse qui soit facilement réalisable au laboratoire, c'est-à-dire celle de l'azote liquide.

Un stock de tissus congelés se présentera ainsi comme un vase Dewar rempli d'azote liquide, où sont immergés les divers tubes contenant les spécimens. Le renouvellement régulier du gaz liquéfié, constitue le seul entretien. Il faut reconnaître néanmoins, que cette solution très satisfaisante du point de vue théorique, devient difficilement applicable en pratique, par suite de la faible « durée de vie » de l'azote liquide.

Toutefois, on peut raisonnablement penser que, en évitant les hautes concentrations salines, il est possible d'éliminer ce grave inconvénient et d'effectuer la conservation de longue durée des tissus, dans la neige carbonique.

Le procédé de cryodessiccation ou lyophilisation.

Son application aux produits biologiques

Il est certain que si le maintien d'un tissu ou d'un matériel biologique complexe à basse température constitue le moyen le plus sûr d'assurer sa conservation de longue durée, les applications du procédé de congélation n'en demeurent pas moins très limitées. En effet, la nécessité impérieuse d'entretenir constamment une température très basse, jointe aux dangers d'altération en cas de léger réchauffement, rendent cette technique délicate et d'un emploi malaisé. C'est pourquoi beaucoup d'auteurs ont cru trouver la méthode idéale dans le procédé de cryodessiccation.

La cryodessiccation ou lyophilisation consiste en une dessiccation effectuée à basse température à partir de spécimens congelés, et obtenue en sublimant la glace sous pression réduite. Il y a donc passage direct du solide au gaz sans qu'à aucun moment il n'apparaisse d'eau à l'état liquide. Le problème délicat du maintien des basses températures, ainsi que les dangers permanents d'un dégel inefficace, trouvent ainsi une solution élégante. De plus, le haut degré de dessiccation des spécimens leur permet de supporter des variations thermiques très importantes et en assure la conservation de longue durée à la température ordinaire.

De nombreuses études théoriques (Greaves [57]), et pratiques (Flosdorf [45], Hénaff [63]), ont été consacrées à la lyophilisation, au cours des dernières années. Elles ont été, dans l'ensemble, orientées vers la conservation des produits altérables, beaucoup plus que vers le maintien de la vie. Il s'agissait en effet de conserver au matériel desséché, son intégrité biochimique et structurale, et rarement a-t-on envisagé, si l'on excepte les bactéries, le problème de la conservation de l'activité vitale.

Nous voudrions, pour terminer ce travail, et à la lumière de ce que nous avons exposé précédemment, étudier d'un point de vue théorique, les principales conditions dans lesquelles on peut espérer conserver la vie des tissus animaux par la méthode de cryodessiccation. Nous indiquerons ensuite brièvement, les résultats que nous avons obtenus avec un appareil expérimental construit pour satisfaire aux principales exigences théoriques.

Dans le but de faciliter l'exposé de ce problème, nous envisagerons successivement les aspects purement physiques du procédé de cryodessiccation, puis les conditions théoriques dans lesquelles il est applicable aux systèmes biologiques, et, enfin, nous exposerons nos résultats expérimentaux.

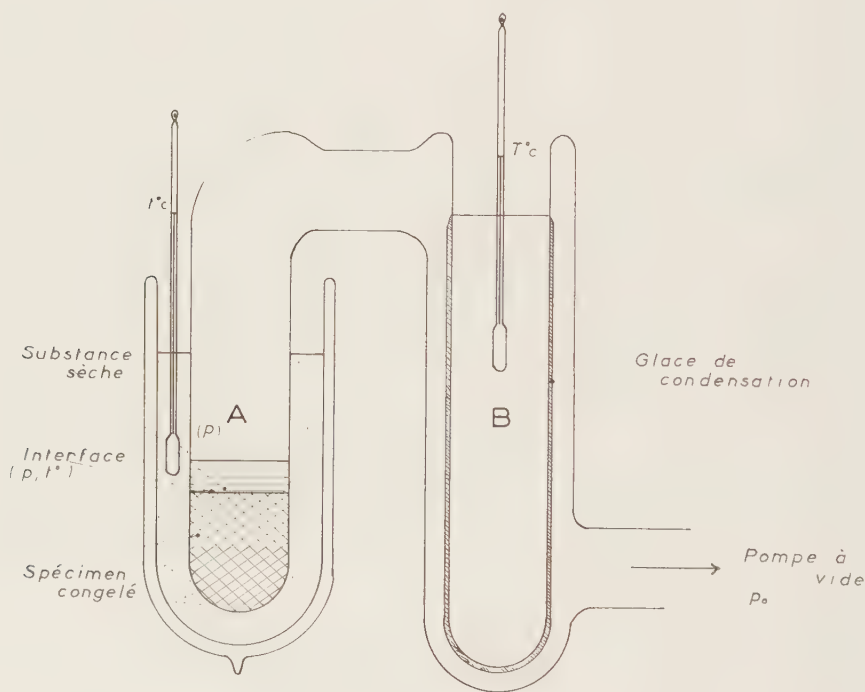


Figure 81. Schéma de principe d'un appareil à lyophiliser.

- A : chambre de dessiccation
- B : piège primaire de condensation
- (p) : pression à l'intérieur de la chambre de dessiccation
- t° : température du spécimen
- T° : température du condenseur
- p° : pression à l'entrée de la pompe à vide

I. Théorie de la cryodessiccation

I. SCHÉMA DE PRINCIPE

Pour étudier plus simplement le fonctionnement d'un appareil à lyophiliser, nous raisonnerons sur un instrument schématique tel que le représente la figure 81.

L'appareil comprend une chambre de dessiccation A, reliée à un piège B connecté à un système de pompes à vide évacuant l'enceinte des deux chambres. Le produit à dessécher est situé dans la première chambre. Nous envisagerons le cas d'une solution aqueuse préalablement congelée et maintenue à une température constante t inférieure à la température de congélation. Nous supposons, tout d'abord, le système clos, en équilibre, la pompe à vide étant arrêtée. Il existe alors, dans la chambre A une pression de vapeur p correspondant à la pression de vapeur saturante de la glace à la température t . Si nous faisons le vide dans des conditions telles que la pression dans l'enceinte A soit maintenue constamment en dessous de p , il se produit une distillation lente de la glace avec émission continue de vapeur. La solution A se desséchera donc progressivement. Pour éviter que la vapeur d'eau aspirée ne pénètre à l'intérieur de la pompe, on utilise un piège (B) maintenu à une température T inférieure à t . Si nous appelons p_0 , la pression correspondant au vide limite donné par la pompe en B, la vapeur d'eau se condensera dans le piège si la température T est telle que la pression de vapeur d'eau saturante de la glace à la température T est inférieure à p_0 . De cette façon, l'eau distillera sous forme de vapeur depuis le spécimen dans la chambre A jusqu'au piège B où elle s'accumulera sous forme de glace. Le régime du flot de vapeur circulant dans l'appareillage entre A et B dépend de la pression existant à l'intérieur de cet appareillage, et par conséquent des deux températures t et T . On peut alors faire plusieurs constatations. Premièrement, la vitesse de dessiccation est d'autant plus rapide qu'il existe une plus grande différence de pression de vapeur entre le condenseur (B) et le liquide congelé, c'est-à-dire que la différence de température entre le condenseur et le spécimen est plus grande. Deuxièmement, si la pression à l'intérieur de l'appareillage est suffisamment haute (de $1/10$ à $1/100$ de mm de mercure), le libre parcours moyen des molécules d'eau est faible en comparaison de la distance qui sépare le spécimen du condenseur. Le régime de la circulation de vapeur est alors du type diffusif et la position du piège par rapport au spécimen a peu d'importance. Par contre, si le vide dans l'appareillage est inférieur à 10^{-3} mm de mercure, le libre parcours moyen des molécules d'eau devient égal ou supérieur à la distance séparant le spécimen du piège et le flot de vapeur est du type moléculaire. Il convient à ce moment que la surface de condensation soit la plus rapprochée possible de la surface d'émission de vapeur, et la position du piège a une influence majeure sur la vitesse de dessiccation.

Une autre constatation que l'on peut faire dans le cas du régime moléculaire est que la température de condensation en B peut varier dans de larges limites en-dessous d'une certaine valeur, sans que les conditions de dessiccation changent de façon appréciable. Elle ne doit jamais, par contre, s'élever au-dessus de la température du spécimen.

2. ETUDE DES CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT

Pour nous rapprocher de l'aspect expérimental du procédé de lyophilisation, nous étudierons les conditions physiques de la dessiccation à l'intérieur de l'appareillage. Comme nous l'avons vu précédemment, les molécules d'eau sont arrachées au niveau de la solution puis transportées à l'intérieur de l'appareillage jusqu'à la surface de la paroi froide du condenseur.

A. Etude de l'interface.

En considérant l'interface cristal-enceinte au niveau duquel s'effectue la sublimation de la glace, nous constatons qu'il est le lieu d'un double échange thermique. D'une part, l'émission ininterrompue de vapeur d'eau à partir de la glace provoque un refroidissement continu de la surface d'émission ; d'autre part, il s'effectue un apport constant de chaleur radiante à partir de l'enceinte périphérique maintenue à la température fixe t . En effet, si nous supposons que le contact thermique entre la solution congelée et le bain périphérique est parfait, de telle sorte que l'ensemble de la solution est à la température t , il est nécessaire pour que t reste constante, d'effectuer un apport calorifique continu à l'intérieur du bain périphérique destiné à compenser exactement le refroidissement provoqué par la sublimation de la glace. Il s'établit ainsi une température d'équilibre (t) qui constitue la température de dessiccation proprement dite. L'apport calorifique représente la chaleur de sublimation de la glace et on a pu l'évaluer à 650 calories par gramme d'eau à la température de -30°C .

B. Emission de vapeur

La vapeur d'eau émise à partir de l'interface doit gagner la surface de condensation à travers l'appareillage pour y déposer de la glace. Ce transfert rencontre un certain nombre d'obstacles, à la fois au niveau du spécimen et à l'intérieur de l'appareil même.

a) *Résistance du spécimen.* Nous supposons que le liquide en cours de dessiccation est déjà partiellement desséché. L'interface s'est donc enfoncé progressivement à l'intérieur de la solution et il est séparé de l'enceinte par une couche plus ou moins épaisse de substance sèche. La vapeur d'eau émise au niveau des cristaux de glace doit alors traverser cette coquille desséchée pour parvenir à l'intérieur de l'enceinte. La traversée de cette coquille dépend de sa structure,

c'est-à-dire de la forme des cristaux de glace d'émission ainsi que de la disposition des mélanges eutectiques, et des lignes de fracture. L'épaisseur de la couche desséchée joue également un rôle, et à épaisseur égale, la forme peut influencer, la sphère étant le volume le plus perméable. Le type même de circulation de la vapeur à l'intérieur de la substance sèche peut entrer en ligne de compte. En première approximation, il existe deux types de régimes possibles : un régime diffusif et un régime moléculaire. Dans le régime diffusif, le libre parcours moyen des molécules est faible en comparaison des vides intercrystallins. Ce sera le cas d'une solution ayant cristallisé en gros cristaux et dont la température t est relativement haute. Dans le régime moléculaire, le libre parcours moyen des molécules d'eau est très grand par rapport aux espaces intercrystallins. C'est le cas d'une solution à structure cristalline fine et à température très basse. Le spécimen s'oppose donc à l'émission de vapeur d'eau à l'intérieur de l'enceinte de dessiccation. Nous conviendrons, avec Gersh et Stephenson [51], d'appeler résistance du spécimen, l'inverse de la probabilité pour qu'une molécule d'eau émise à partir d'un cristal de glace atteigne la surface extérieure avant qu'elle ne soit fixée à nouveau sur un autre cristal.

b) Résistance de l'appareillage. De la même manière, nous appellerons résistance de l'appareillage l'inverse de la probabilité pour qu'une molécule d'eau quittant la surface extérieure de la solution congelée, atteigne la surface de condensation sans entrer à nouveau dans la coquille sèche. Cette résistance dépend, d'une part du volume de vapeur émis, d'autre part du type d'émission de cette vapeur. Pour un flot diffusif, la résistance sera d'autant plus faible que la distance entre le spécimen et le condenseur sera plus faible et la différence de pression à leur niveau plus grande. Si le flot, par contre, est du type moléculaire, la résistance de l'appareillage devient indépendante de la pression et dépend principalement de la forme géométrique de l'appareillage.

Le régime diffusif s'étend de la pression atmosphérique normale où le libre parcours moyen d'une molécule est de 0,05 micron jusqu'à une pression de 10^{-3} mm de mercure où le libre parcours moyen est de l'ordre de 5 cm. Pour des pressions inférieures à 10^{-4} mm de mercure, le libre parcours moyen devient de l'ordre des dizaines de centimètres ou des mètres, et la résistance de l'air résiduel devient négligeable. Pour dessécher une solution maintenue à très basse température, il est nécessaire que la température de condensation soit plus basse encore et par conséquent que la pression à l'intérieur de l'appareillage soit très faible. Si l'on désire alors que la sublimation se fasse à une vitesse raisonnable, il conviendra d'étudier de très près la forme géométrique du dispositif pour que les molécules d'eau émises à partir du spécimen atteignent la surface de condensation, soit directement, soit après une ou deux réflexions, au plus, sur les parois de l'appareillage. Dans ce cas-là, il suffira que l'angle solide ayant pour sommet

le centre du spécimen à dessécher et enveloppant la surface de condensation, soit le plus ouvert possible.

e) *Formation de la glace au niveau de la surface de condensation.* Au niveau de la surface de condensation, la vapeur d'eau émise dépose une couche de glace et les conditions de ce dépôt dépendent d'un certain nombre de facteurs.

Il existe une certaine énergie de collage nécessaire pour qu'une molécule heurtant la surface de condensation y reste adhérente au lieu de repartir. En pratique, pour toutes les températures inférieures à -100°C , les molécules se fixent au premier choc. Il en résulte, pour les températures supérieures, qu'il peut se produire au niveau de la surface de condensation des réflexions parasites de vapeur. Ce phénomène peut avoir diverses conséquences. Tout d'abord, si la surface de condensation est perpendiculaire au trajet direct de la vapeur partant du spécimen, et si le degré du vide est tel que le libre parcours moyen des molécules d'eau soit de l'ordre de la distance séparant la surface de condensation du spécimen ou légèrement inférieur, il pourra se créer une zone de turbulence à mi-distance entre le condenseur et le spécimen, ce qui retardera considérablement la vitesse de sublimation. Par contre si la pression est plus faible ou plus forte, c'est-à-dire si le régime du flot de vapeur est strictement moléculaire ou strictement diffusif, ce phénomène n'apparaîtra pas.

Un autre cas peut se présenter. Si le régime du flot de vapeur est moléculaire et la surface de condensation trop faible ou mal orientée par rapport au spécimen, les multiples réflexions parasites entraîneront un retard considérable à la condensation, et par conséquent une augmentation très nette de la durée de dessiccation.

Une remarque supplémentaire s'impose au sujet du condenseur. Il convient de noter que la seule température que l'on connaisse avec certitude est celle de la surface même du condenseur, et non celle de la surface réelle de condensation. En effet, au bout d'un certain temps de fonctionnement, une épaisse couche de glace s'est déposée autour du condenseur, et l'on ignore en grande partie comment le transfert de chaleur s'effectue à travers cette glace de condensation. C'est pourquoi il est toujours préférable de garder une marge de sécurité et de travailler avec un condenseur ayant une température plus basse d'environ 10 à 15 degrés, que la température théoriquement nécessaire donnée par le calcul.

II. La cryodessiccation des systèmes biologiques et principalement des tissus animaux

1. CONGÉLATION INITIALE DU SPÉCIMEN

La première étape consiste à amener le tissu ou le système qui doit être desséché, à l'état congelé. Cette congélation ne doit pas être quelconque et comme nous l'avons vu précédemment, elle doit respecter un certain nombre d'exigences précises. Il n'y a, en effet, aucun intérêt à dessécher avec soin un spécimen qui a été altéré au cours de la congélation préalable. Nous tenons à insister sur ce point, bien qu'il semble évident, car dans la grande majorité des cas, les auteurs qui ont étudié la cryodessiccation des substances biologiques semblent l'avoir totalement négligé.

A. Vitesse de congélation

La vitesse de congélation doit de préférence être élevée. Ceci permet, d'une part de diminuer notablement le temps d'action des solutions hypertoniques se développant avant la cristallisation des mélanges eutectiques, et d'autre part, d'obtenir des cristaux de très petite taille. Après dessiccation, chaque cristal laisse en effet un vide et pour que le produit se reconstitue de la façon la plus homogène possible, il est nécessaire que sa structure soit très fine. La vitesse de congélation peut être modifiée de façon indirecte, comme nous l'avons vu précédemment, par l'addition de certaines substances organiques qui diminuent la vitesse de propagation du front cristallin et assurent une certaine protection contre le choc osmotique.

B. Types de congélation

Si l'on désire obtenir une sublimation rapide, il convient que le produit présente une grande surface et une faible épaisseur. C'est pourquoi, de manière générale, on desséchera des échantillons minces ou des solutions congelées par le procédé de congélation-rotation en une couronne fine et régulière. Il ne semble pas que la méthode soit applicable à des fragments très épais et de structure compacte.

C. Température finale de congélation

Pour qu'il ne se présente pas de phase liquide résiduelle à l'intérieur du spécimen à dessécher, il faut que la température finale de congélation se situe en dessous de la zone des eutectiques. En effet, en dehors même des altérations lentes et irréversibles produites par les solutions hypertoniques, la présence d'un liquide interstitiel peut produire lors de la mise sous vide une ébullition brusque accompagnée d'une production abondante de mousse amenant une dénaturation du produit. C'est ce que Florsdorf [45] a appelé le *Puffing*. Pour la même raison

la dessiccation en elle-même devra être conduite à une température toujours inférieure à la température eutectique.

2. SUBLIMATION DE LA GLACE

La manière dont la glace se sublime dépend, dans une grande mesure, de la nature même du spécimen, et, en particulier, de sa teneur en glycérol. Nous examinerons donc séparément les systèmes qui ne contiennent pas de glycérol, et ceux pour lesquels une imprégnation préalable a été réalisée.

A. Systèmes biologiques ne contenant pas de glycérol

Les conditions de lyophilisation proprement dite devront assurer un heureux équilibre entre la température et le vide. En effet, s'il est nécessaire que la température du tissu soit suffisamment basse pour prévenir toute altération, comme nous venons de le voir, il faut d'autre part, qu'elle soit suffisamment haute pour que la glace se sublime à une vitesse raisonnable. Les températures du spécimen et du condenseur devront donc être ajustées avec soin, et le degré du vide utile en dépendra directement. Pour travailler à basse température, le vide devra être très poussé et nécessiter, au minimum, un groupe de pompage comprenant une pompe à palettes à deux étages et une pompe à diffusion.

L'un des points les plus délicats est peut-être le réglage très précis de l'apport calorifique en cours de dessiccation. Nous avons vu que la température du produit ne doit pas s'élever au-dessus de celle des mélanges eutectiques qui peuvent apparaître. Il faut que ces conditions soient maintenues durant toute la dessiccation. Il est strictement illogique, en effet, de prétendre que la température au niveau du spécimen puisse s'élever au fur et à mesure que la dessiccation avance. Il suffit de penser que les conditions physiques mêmes de la méthode font que toute partie qui est desséchée l'est totalement, et que, au contraire, partout où il persiste encore de la glace, l'hydratation est maximum. La dessiccation progresse par points successifs et ce n'est qu'en intégrant l'ensemble de ces dessiccations individuelles que l'on obtient la déshydratation totale du produit. Pour maintenir au niveau de la surface d'évaporation une température constante, il faut lui fournir un apport calorifique extérieur et c'est là que l'on rencontre les plus grandes difficultés. Dans l'étude théorique, nous avons supposé, en effet, que le contact thermique entre la source de chaleur et le produit était parfait : mais, dans l'application pratique, le flux de chaleur ne parvient à la surface d'évaporation qu'à travers un ensemble plus ou moins complexe de couches dont la conductibilité thermique est très variable. Le plus souvent, le spécimen est contenu dans un récipient en verre qui est en contact plus ou moins régulier avec la surface chauffante et le gradient thermique varie suivant la nature et l'épaisseur des matériaux à traverser. Dans beaucoup

d'appareillages industriels, seul le fond des récipients repose sur la surface chauffante et, de ce fait, la répartition du flux de chaleur est très inégale, et une faible partie de l'apport calorifique parvient effectivement au lieu de sublimation. On est conduit alors à utiliser des plateaux chauffants à température très élevée (+ 50° C à + 80° C) et il y a lieu de craindre, non seulement que la température de la masse congelée s'élève très au-dessus de l'eutectique, mais en outre, qu'il se produise des phénomènes de fusion localisée ainsi que des surchauffes considérables du produit sec. En effet, le danger ne se présente pas au niveau même où se produit la sublimation, niveau constamment refroidi par le départ de vapeur, mais à l'intérieur même de la masse du produit qui reste à dessécher ou qui est déjà sec. Or dans les conditions précédentes, la température est loin d'être uniforme : il existe des gradients thermiques considérables entre l'interface d'évaporation, l'intérieur encore congelé du spécimen, l'enveloppe sèche périphérique, l'enceinte extérieure et les plateaux chauffants. Lorsque la glace a fini de se sublimer, la température s'élève et l'on reconnaît généralement la fin de la période de dessiccation au fait que la température du produit dans son ensemble devient identique à la température des plateaux. Il est aisé de constater que, pour toutes les raisons citées précédemment, une lyophilisation effectuée dans ces conditions offre, pour beaucoup de substances, des risques très importants de dénaturation.

Une solution beaucoup plus rationnelle et se rapprochant davantage des conditions idéales de fonctionnement consiste à stabiliser la température du produit en l'engainant, par exemple, dans une masse métallique refroidie par une circulation réfrigérante. De cette manière, il est possible d'effectuer un apport calorifique modéré, par l'intermédiaire du fluide réfrigérant qui contrôle la température de la masse métallique. Cette masse constitue en plus une réserve thermique importante qui s'oppose aux fluctuations locales de température. De cette manière, la répartition de la chaleur est beaucoup plus régulière et, si l'on ne peut connaître avec certitude la température exacte de la zone d'évaporation, on peut être sûr, du moins, qu'à aucun moment un point quelconque du spécimen n'aura une température supérieure à celle du plateau. De ce fait, il ne devient plus possible d'apprécier la fin de la dessiccation par l'élévation de la température du produit, mais l'amélioration brutale du vide en fin d'évaporation constitue un critère à la fois facile et beaucoup plus exact.

B. Systèmes biologiques contenant du glycérol

Lorsque le tissu à dessécher a été imprégné au préalable par une solution glycérolée, le problème est beaucoup plus délicat. En effet, ainsi qu'il l'a été constaté par de nombreux auteurs, le glycérol ne peut en aucun cas se sublimer à basse température. Il retarde, de plus, le départ de vapeur en enveloppant les cristaux

de glace. Enfin, il fixe une partie importante de l'eau tissulaire en l'annexant sous forme d'eau liée. Le principal résultat de la cryodessiccation consiste donc à concentrer le glycérol, et le spécimen, en fin d'opération, baigne dans du glycérol presque pur. Il est bien évident qu'alors, l'objectif de la méthode ne se trouve pas atteint, et que le tissu ne peut se conserver longtemps à la température ordinaire en présence d'une solution concentrée de glycérol. Des faits semblables ont été également constatés par d'autres auteurs (Polge [156], Parkes [143]), et l'on a cherché récemment une solution détournée à ce problème, en essayant d'utiliser le méthanol comme liquide protecteur (Polge [156], Parkes [143]). On peut cependant affirmer que dans les cas où un faible pourcentage de glycérol est suffisant pour assurer une protection efficace au cours de la congélation, la lyophilisation reste possible par suite de l'absorption du glycérol par les protéines cellulaires (Rey [170]).

3. RECONSTITUTION DU PRODUIT DESSÉCHÉ

Pour pouvoir observer de nouveau les manifestations vitales du tissu desséché, il est nécessaire de le réhydrater. Cette phase de reconstitution est, peut-être, l'une des plus délicates. Son succès dépend non seulement de la manière dont la dessiccation a été réalisée, mais aussi, du degré de siccité que l'on a atteint. En effet, certaines structures colloïdales sont altérées de façon irréversible lorsque l'on retire leur eau de constitution, et elles ne sont pas susceptibles de se régénérer lorsqu'on les réhydrate. Il faut éviter également que l'eau soit mal répartie et qu'il risque ainsi de se produire des dilutions excessives de certaines parties liquides du spécimen, tandis que d'autres restent en solution concentrée.

Comme nous pouvons le voir, la cryodessiccation est une opération très délicate et un très grand nombre de facteurs peuvent intervenir. Malgré cela, certaines des conditions physiques essentielles ont pu être dégagées par l'étude théorique (Rey [172, 167]), et c'est dans le but de les respecter au maximum que nous avons réalisé l'appareil expérimental que représente la figure 82. Avant d'en aborder la description, nous tenons à souligner que le fait de remplir un certain nombre d'exigences physiques, au cours de la congélation préalable puis de la dessiccation, est loin de suffire à assurer le succès de l'opération. De nombreux facteurs en effet dépendent de la nature même du spécimen, comme le degré de dessiccation à atteindre, le procédé de réhydratation, etc..., et bien peu d'informations précises sont actuellement disponibles à ce sujet.

III. Appareil expérimental pour lyophilisation à basse température

1. DESCRIPTION DE L'APPAREIL

L'étude préliminaire que nous venons de faire nous a montré que, pour être utilisable, dans le cas qui nous intéresse, un appareil à lyophiliser devait réunir

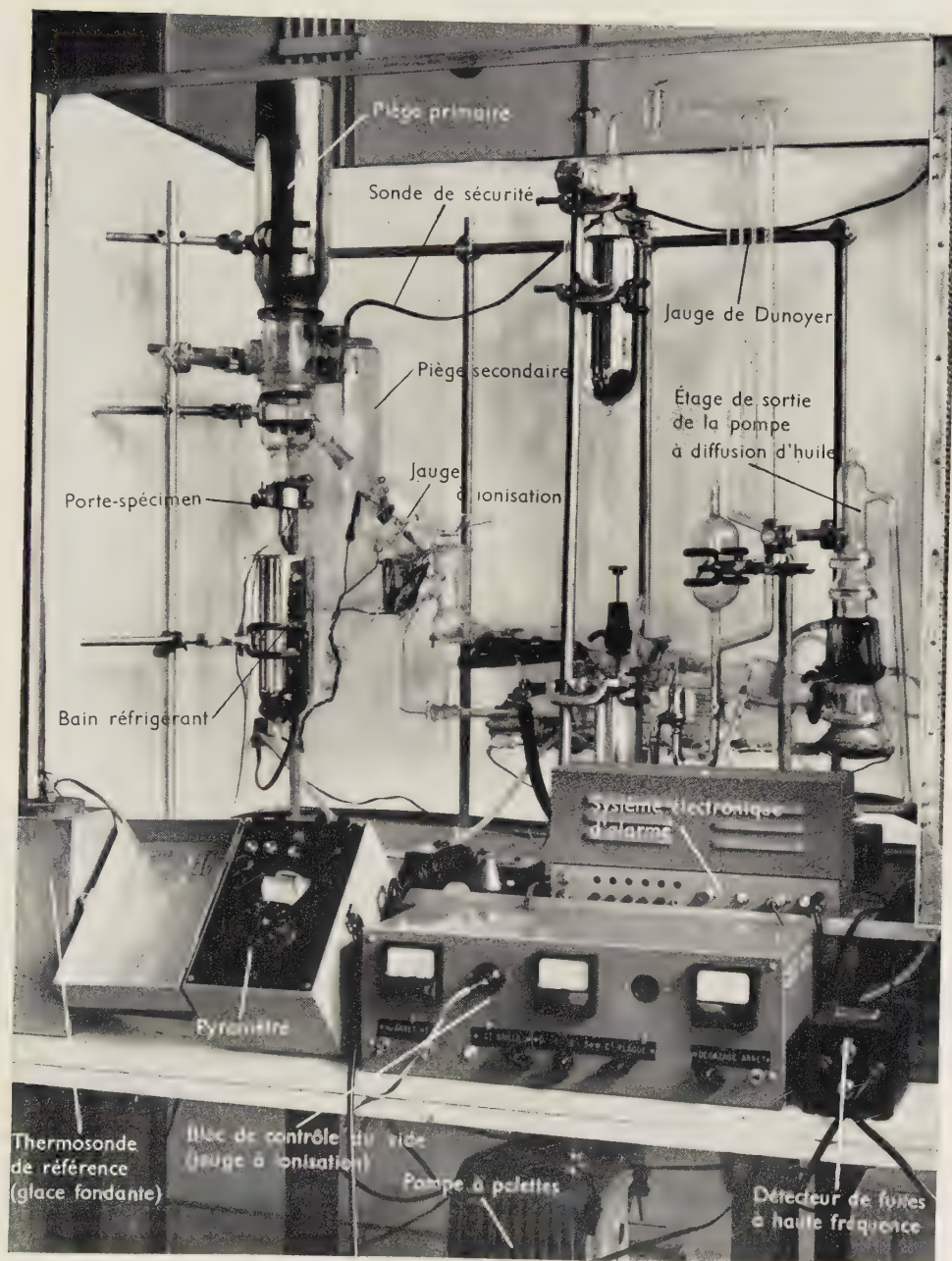


Figure 82. Appareil de laboratoire pour lyophilisation expérimentale à basse température.

les conditions suivantes : assurer le maintien de la température du spécimen à une valeur constante, pendant toute la durée de la dessiccation : permettre d'effectuer les dessiccations à basse température, et, par conséquent, fonctionner avec un vide élevé ; disposer de systèmes très précis de mesure et de contrôle du vide, pour que l'on puisse apprécier exactement la fin de la déshydratation.

Notre appareil satisfait à ces trois exigences. Il comporte une chambre de dessiccation conique en verre pyrex, terminée à sa partie inférieure par un porte-spécimen métallique (figure 83). Un thermocouple inséré dans le bloc de métal et parvenant à 2/10 de mm de sa surface supérieure, indique la température. Le spécimen est déposé à la surface du bloc métallique et une goutte d'huile silicone assure un bon contact thermique et diminue, de ce fait, l'importance des échanges thermiques effectués par radiation à l'intérieur de l'enceinte. Sur le côté de la chambre, est soudée une jauge à ionisation. Au-dessus de la chambre et tout près du spécimen (15 mm), se trouve la surface de condensation constituée par la partie interne d'un vase Dewar argenté, rempli d'azote liquide. De cette manière, et par suite de la forme particulière de la chambre de dessiccation, les molécules d'eau atteignent la surface de condensation, soit directement, soit après une réflexion au plus. Un piège secondaire, situé postérieurement, sert à la protection des pompes et une jauge d'alarme à thermistor y est plongée pour que le niveau d'azote liquide ne risque pas de devenir trop faible pour empêcher le passage de vapeur d'eau dans la pompe à diffusion. En effet, faisant suite au piège secondaire, se trouve le groupe de pompage assurant le vide élevé, constitué par une pompe à diffusion d'huile silicone à 4 étages, refoulant dans une pompe à palettes à 2 étages.

La température du spécimen peut être ajustée avec soin en contrôlant la température de la pièce métallique qui le porte. Cela s'effectue jusque vers -70°C , en l'immergeant dans un mélange de neige carbonique et d'alcool, à température fixe, contenu dans un vase Dewar. Pour obtenir des températures basses, on emploie une enceinte thermostatique à évaporation d'azote liquide, analogue à celle que nous avons décrite au début de ce travail (figures 3 et 4). On peut, d'ailleurs, l'employer également pour les températures intermédiaires. La stabilité thermique de la pièce métallique est, en général, supérieure à 1/10 de degré Celsius.

2. ÉTUDES DES CONDITIONS DE FONCTIONNEMENT

A. Caractéristiques de l'appareil

Le vide primaire donné par la pompe à palettes à double étage est de l'ordre de 1 à $1,5 \cdot 10^{-3}$ mm de mercure. Les pertes de charge à l'intérieur de l'appareillage sont pratiquement nulles. Le vide secondaire fourni par la pompe à diffusion

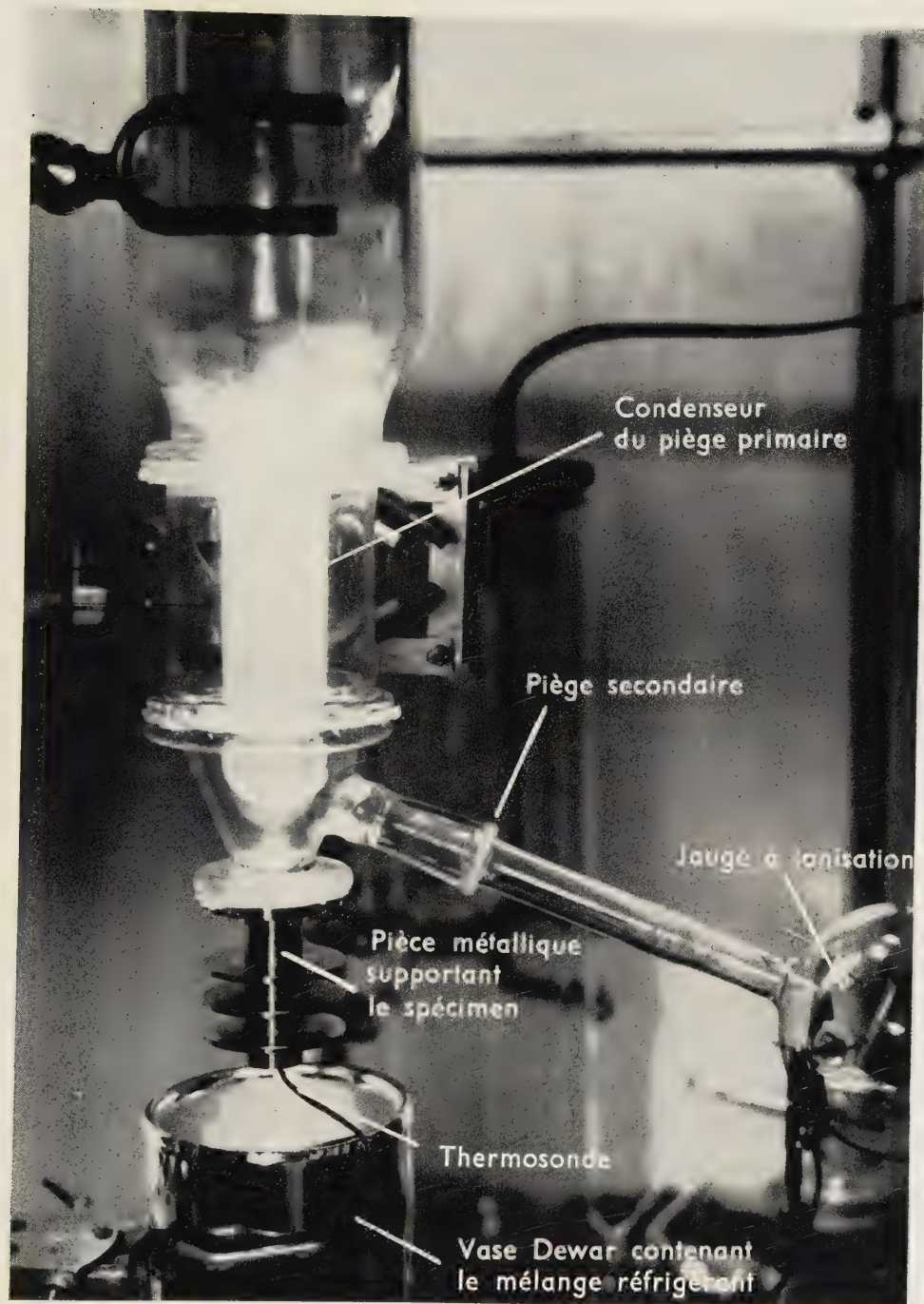


Figure 83. Détail du porte-spécimen utilisé pour les cryodessiccations à très basse température. Le piège primaire rempli d'azote liquide est éclairé par l'intérieur.

sur elle-même est de 5.10^{-7} mm Hg, et lorsque l'appareil est parfaitement desséché avec les pièges vides, on peut atteindre, dans la chambre de dessiccation, un vide de l'ordre de 10^{-6} mm Hg. Les pertes de charge entre la pompe à diffusion et le spécimen sont donc relativement très réduites.

Lorsqu'on remplit le piège de protection, seul, d'azote liquide, la pression de vapeur d'eau à l'intérieur de l'appareillage diminue considérablement dans le voisinage de la surface refroidie. Toutefois, dans la chambre de dessiccation, le vide demeure de l'ordre de 10^{-6} mm Hg. Si l'on remplit alors le piège primaire d'azote liquide, le vide tombe très rapidement et se stabilise à $1,5.10^{-7}$ mm Hg. Les surfaces de condensation fonctionnent donc, à l'égard de la vapeur d'eau et des gaz résiduels condensables, comme une pompe, à vide limite très élevé mais à débit extrêmement faible. En effet, il suffit de couper la pompe à diffusion pour qu'en quelques secondes le vide atteigne 10^{-5} mm Hg. Il est impossible, évidemment, de préciser d'où proviennent la vapeur d'eau et les résidus condensables. Il s'agit d'un phénomène de dégazage généralisé, affectant toutes les parois de verre. Il convient de remarquer qu'un vide très élevé peut quand même être atteint. Ceci tient en grande partie au fait, qu'à part le porte-spécimen, il n'y a pas de surface métallique libre à l'intérieur de l'appareillage. Les métaux, en effet, peuvent absorber des quantités de gaz très importantes et ne les cèdent que lentement à température élevée. Pour éviter d'ailleurs cette action, l'appareillage est constamment gardé sous vide entre deux expériences et la pompe à diffusion d'huile isolée du reste du circuit.

B. Fonctionnement en cours d'évaporation

Le fonctionnement en cours d'évaporation dépend évidemment de la température du spécimen. La tension de vapeur de la glace s'abaisse en effet très vite avec la température. De l'ordre de 4.10^{-4} mm Hg à -80° C, elle est de 10^{-5} mm Hg à -100° C, de 10^{-10} mm Hg à -120° C, et de 10^{-23} mm Hg à -196° C.

Pour étudier comment se fait l'évaporation, nous prendrons le cas de la lyophilisation d'un fragment de tissu maintenu à -100° C. Supposons que la dessiccation soit déjà en cours, de telle sorte que la surface de sublimation ait pénétré un peu à l'intérieur du spécimen. Au niveau de l'interface cristal de glace, vide extérieur, la pression de vapeur de la glace est pratiquement saturante et de l'ordre de 10^{-5} mm Hg. Le vide à l'intérieur de la chambre de dessiccation en cours d'évaporation est, pour cette température, d'environ 10^{-7} mm Hg. Ceci représente principalement la pression partielle de l'air résiduel, car à l'intérieur de la chambre de dessiccation, la pression partielle de la vapeur d'eau s'abaisse très rapidement dès que l'on s'éloigne du spécimen, et, pratiquement, elle est égale ou inférieure à 10^{-15} mm Hg. L'appareil travaille donc dans des conditions d'évaporation optima puisque la pression partielle de l'air (10^{-7} mm

de mercure) se trouve être de l'ordre du centième de la pression saturante de vapeur d'eau à l'interface, ce qui est en accord avec une règle formulée par divers auteurs (Carman, Kramers, Stemerding et Stephenson [51]). Lorsque le flot de vapeur émis depuis l'interface a traversé la coquille de tissu sec qui entoure le centre encore congelé, il faut, pour que la dessiccation s'achève, que les molécules d'eau gagnent la surface de condensation. Le régime d'émission de la vapeur à l'intérieur de l'enceinte est strictement moléculaire par suite du vide élevé qui y règne. En effet, le libre parcours moyen des molécules d'eau à la pression de 10^{-7} mm Hg, est de l'ordre de 500 mètres et il faut donc que les molécules d'eau atteignent la surface de condensation de la façon la plus directe possible, sinon, elles risquent de rebondir par réflexions successives sur les parois de l'appareillage pendant longtemps avant de se fixer au niveau du condenseur. La surface de condensation se trouvant d'ailleurs à une température très inférieure à -100°C , les molécules se fixent dès leur premier choc et il n'y a pas de réflexions parasites sur le condenseur. Grâce à la proximité du condenseur, cette fixation est très rapide, ce qui explique la très faible durée des opérations de dessiccation. Ainsi, pour un fragment de peau d'embryon de 0,8 mm d'épaisseur, il suffit de 30 minutes pour obtenir une déshydratation complète à -30°C . A -50°C , 4 heures sont nécessaires. A -100°C , une couche monocellulaire est sèche en un ou deux jours au plus. Cependant, il ne semble pas utile de recourir à des températures aussi basses, et, dans la plupart des cas, la température de -60°C s'avère très satisfaisante.

IV. Premiers résultats expérimentaux

La majeure partie de nos résultats concerne, soit des fragments de tissus cardiaques de l'embryon de poulet, soit des étalements monocellulaires obtenus à partir de cultures pures en milieu liquide (Souche L).

Nous avons vu précédemment ce qu'il advenait des préparations contenant du glycérol, aussi n'y reviendrons-nous pas.

Lorsqu'il n'y a pas de glycérol, la dessiccation s'effectue fort bien en un temps très court. Les tissus sont généralement congelés brutalement dans le propane liquide, lavés dans l'azote liquide, déposés sur la pièce métallique, refroidie à la température voulue, puis finalement desséchés. En l'absence de liquide protecteur, il faut, en effet, chercher dans les hautes vitesses de refroidissement la solution permettant le maintien de la vie. Luyet [101] et Meryman [116] ont particulièrement insisté sur ce point, ce qui justifie notre méthode de congélation très rapide. Après dessiccation, on laisse le spécimen se réchauffer jusqu'à la température ordinaire, après avoir « cassé » le vide par l'introduction d'un gaz sec. On le conserve alors 24 heures à la température ordinaire, dans une

enceinte sèche, hermétique, puis on évalue son degré de conservation et son activité vitale.

Pour apprécier le degré de conservation du tissu, on fait appel à l'observation directe (contraste de phase et lumière polarisée) des cellules desséchées suivie de contrôles cytologiques après reconstitution. Ces divers examens montrent que, lorsque la dessiccation est réalisée à -60°C , la structure fine des tissus est parfaitement conservée. Il semble toutefois que la dessiccation à des températures plus basses donne des résultats légèrement meilleurs. Par contre, en ce qui concerne le maintien de la vie, nos résultats ont été entièrement négatifs jusqu'à présent, et aucune préparation placée en culture de tissus n'a donné lieu à des phénomènes de croissance ou de migration.

Nos résultats concordent donc, hélas ! avec ceux de tous les auteurs, sans exception, qui ont abordé le problème de la lyophilisation des tissus animaux dans les conditions où nous l'avons réalisée, c'est-à-dire, qui ont maintenu leur spécimen à une température de $\pm 20^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures au moins, avant de la reconstituer.

Conclusion

Il est certain que si l'on considère uniquement le problème de la conservation de la vie de tissus animaux complexes grâce au procédé de cryodessiccation, notre conclusion se devra d'être pessimiste. Cependant, si l'on prend la précaution de noter, comme le remarque A. S. Parkes [143], que, il y a dix ans à peine, la conservation des tissus par le froid semblait également désespérée, on peut, on doit, envisager l'avenir avec confiance.

La cryodessiccation nous apporte en effet la preuve éclatante que les structures cellulaires, même les plus délicates, peuvent être conservées de façon parfaite. Il y a donc des raisons très sérieuses de penser que l'on pourra, grâce aux recherches futures, trouver un heureux état d'équilibre entre la congélation préalable, le choix des liquides protecteurs, la température de dessiccation, le degré de déshydratation à atteindre et le processus de reconstitution, pour que soit rendue possible la conservation de la vie. On aura alors pu combler le vide qui sépare actuellement les organismes supérieurs des tardigrades ou des rotifères, et la solution aura été trouvée qui permettra de suspendre l'activité vitale pour des temps peut-être indéfinis.

Discussion générale et conclusion

Lorsque l'on envisage les effets généraux des basses températures sur les tissus animaux, on constate, tout d'abord, que l'apparition de glace à l'intérieur des cellules est le plus souvent léthale. Nous avons pu voir que des tissus normaux, n'ayant subi aucun traitement préalable, ne survivaient pas à la cristallisation qui résultait d'une exposition prolongée à des températures inférieures à 0° C. L'ensemble de l'organe était mort, et si quelques rares cellules demeuraient vivantes, leur activité n'était que de courte durée. Cependant, dans certains cas, cette maigre survie est suffisante. Ainsi, beaucoup de carcinologues conservent leurs souches leucémiques par congélation simple. Il faut toutefois noter, d'une part que les tissus cancéreux sont, de manière générale, beaucoup plus résistants au froid que les tissus normaux et que, d'autre part, un très faible pourcentage de cellules vivantes est suffisant pour donner de nouveau la maladie par inoculation.

Si l'on désire, au contraire, que le tissu manifeste, après congélation et dégel, une activité physiologique normale, il faut le traiter préalablement par un liquide protecteur. Parmi tous ceux que l'on a pu étudier, le glycérol est certainement celui qui a donné les meilleurs résultats.

N'étant pratiquement pas toxique, il peut être ajouté en quantités importantes aux solutions physiologiques dans lesquelles baigne le tissu. Il diffuse ensuite rapidement à l'intérieur du fragment et pénètre dans les cellules dont il ralentit l'activité métabolique. Au cours de l'exposition ultérieure aux basses températures, le glycérol impose pratiquement son propre comportement aux systèmes biologiques dont il fait partie. Il modifie ainsi profondément les réactions du matériel vivant, et son action protectrice est une conséquence directe de ses propriétés physico-chimiques.

Nous avons étudié, à l'aide d'exemples précis, le phénomène de protection

et nous avons recherché les conditions optima de congélation, de stockage et de dégel qui permettaient le degré le plus élevé de survie. Nous avons, ensuite, analysé le mécanisme physico-chimique de la protection apportée par le glycérol. De l'ensemble de notre travail, nous avons pu dégager un certain nombre de conclusions que nous voudrions souligner en terminant.

I. Etude de la résistance aux basses températures du tissu cardiaque de l'embryon de poulet et de la peau du rat et de la souris. Mise en évidence du rôle protecteur du glycérol

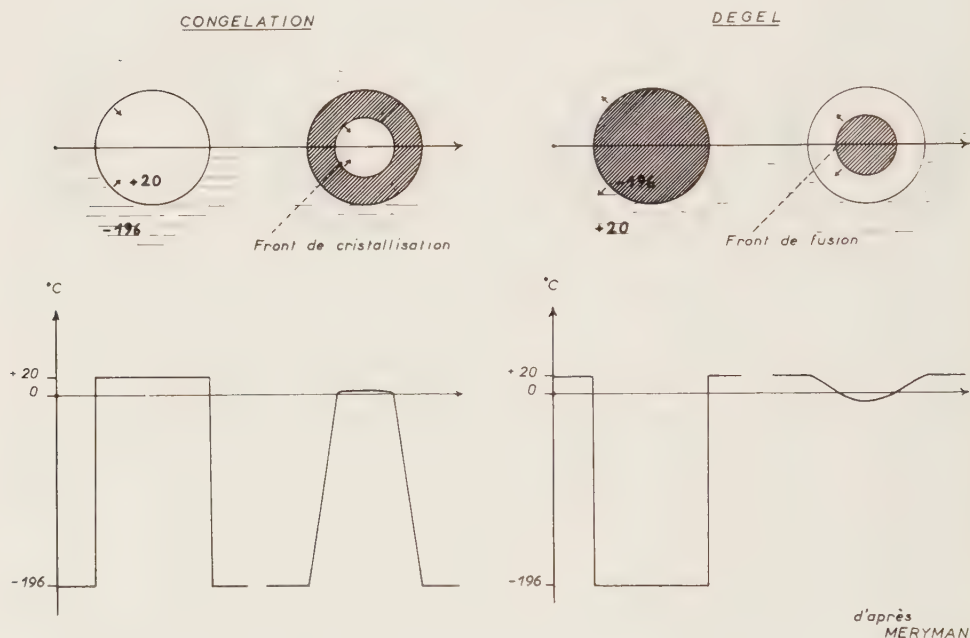


Figure 84. Evolution des températures dans une sphère de liquide aqueux, isotrope et non miscible, plongée dans un bain isotherme, avec un contact thermique parfait (théorique, d'après Meryman). En hachures : partie congelée. Le diagramme inférieur indique les températures le long de l'axe de la sphère

*Le tissu cardiaque du poulet, comme la peau du rat et de la souris, congelé directement à basse température, sans traitement préalable, ne survit pas. Par contre, l'addition de faibles quantités de glycérol est suffisante pour qu'un grand nombre de cellules demeurent vivantes.

*Il existe une concentration optima de glycérol, et également une durée particulière d'imprégnation. Pour le cœur de l'embryon de poulet et la peau des

rats et souris, un séjour de 30 minutes à une heure dans une solution physiologique contenant 30 % de glycérol, en poids, donne des résultats excellents et offre une protection totale.

*Le maximum d'altérations se produit lors du séjour à des températures comprises entre 0° C et — 50° C.

*Cela peut expliquer pourquoi le dégel doit être le plus rapide possible et pourquoi il constitue la phase critique. C'est, en effet, au cours du réchauffement que le tissu reste exposé le plus longtemps aux températures élevées proches de 0° C. Ceci tient à la faible chaleur spécifique de la glace et à sa bonne conductivité thermique. Lors du refroidissement, la température s'abaisse rapidement à l'intérieur du matériel cristallisé. Pendant le dégel, au contraire, comme la masse congelée se réchauffe très vite et fond ensuite lentement, la température du spécimen demeure très longtemps dans une zone thermique défavorable (figure 84, d'après Meryman [115]).

*Le séjour aux basses températures n'entraîne pas de modifications, même lointaines, de l'activité physiologique. Le cœur entier de l'embryon de poulet, correctement imprégné, congelé, conservé et dégelé, se comporte *in vitro* de façon identique à un cœur témoin. De même, des greffes durables et fonctionnelles de peau ont pu être obtenues chez la souris et le rat à partir de tissus congelés.

*La valeur de la température de stockage est essentielle pour la conservation de longue durée. Nous avons constaté qu'elle devait être toujours inférieure à — 60° C lorsque les tissus avaient été imprégnés par du liquide d'Earle contenant moins de 45 % de glycérol. Pour des solutions plus riches en glycérol, on ne peut envisager la conservation à des températures supérieures à — 130° C. En pratique, nous avons utilisé, soit la neige carbonique (— 79° C), soit l'azote liquide (— 196° C) comme sources de froid.

*Dans des conditions optima, la durée de conservation dans l'azote liquide semble indéfinie.

II. Etude du mécanisme physico-chimique de la protection apportée par le glycérol

Grâce à des techniques originales, nous avons pu obtenir les principaux résultats suivants :

*Au cours de la période initiale de refroidissement, de 0° C à — 20° C, l'addition

de glycérol exerce une très grande influence sur les phénomènes de cristallisation. En effet, le glycérol abaisse la vitesse de propagation du front cristallin, diminue la taille des cristaux formés et facilite la surfusion. De plus, au cours de la séparation de l'eau sous forme de glace, il dilue les solutions salines interstitielles et, en pénétrant dans les cellules, contribue à rétablir l'équilibre osmotique.

*Lors du passage des températures intermédiaires, de -20°C à -80°C , la présence de glycérol a pour effet principal de régulariser le processus de cristallisation en supprimant les phénomènes eutectiques dus aux mélanges salins, et en le rendant réversible. Il repousse de plus, les frontières d'eutexie et facilite la formation de structures vitreuses.

*L'étude des propriétés thermodynamiques des tissus congelés, entre -80°C et -196°C , montre que des réactions solides très importantes peuvent se produire et que certaines d'entre elles provoquent des altérations irréversibles.

En conclusion, nous pouvons donc dire que l'ensemble des propriétés physico-chimiques que manifestent les tissus imprégnés par du glycérol à basse température, se déduisent intégralement des propriétés propres du glycérol lui-même qui exerce ainsi un rôle prédominant. Il existe cependant un cas particulier où cette influence est néfaste. En effet, c'est à cause des propriétés très spéciales du glycérol, qu'il a été impossible jusqu'alors, d'envisager la cryodessiccation de tissus vivants. On peut, toutefois, espérer qu'il sera possible dans l'avenir de trouver une solution de compromis.

Si l'on envisage alors les effets généraux des basses températures sur le matériel biologique, nous pouvons constater qu'elles offrent la possibilité de conserver, pendant longtemps, des structures altérables et très fragiles. En dehors de l'intérêt purement spéculatif qu'elle peut donc présenter, la méthode de congélation des tissus a permis de concevoir et de réaliser ces *Banques de tissus conservés* que prévoyait Carrel. Des milliers d'opérations d'urgence ont pu, ainsi, avoir lieu à partir d'os, de vaisseaux, de cornées, lyophilisés ou congelés.

Jusqu'alors, on a surtout fait appel à des tissus dont la fonction mécanique l'emportait sur l'activité physiologique (Rey [169]). Il n'était, dès lors, pas nécessaire de les conserver vivants et le froid ne servait qu'à garder intacte leur structure physico-chimique. Toutefois, des recherches récentes tendent à élargir le champ d'applications des *Banques de tissus* en faisant appel aux greffons endocriniens. Il s'agit alors de tissus où l'activité physiologique des éléments cellulaires est primordiale, aussi a-t-on recours à des méthodes analogues à celles que nous avons décrites.

Les applications biologiques de la congélation des tissus ont donc quitté

le laboratoire de recherches, pour s'ouvrir largement sur des problèmes d'ordre clinique.

Toutefois, les résultats pratiques ne sont pas les seuls que l'on doive considérer dans le cadre général des effets physiologiques du froid. Les basses températures offrent en effet, comme l'a fait remarquer Becquerel [5], la possibilité de suspendre l'activité vitale pendant des durées indéfinies, et il n'est pas nécessaire d'insister sur la portée philosophique de ce fait. Il est donc possible de substituer la rigueur structurale et permanente de l'état cristallin à la physionomie mobile et polymorphe de l'état vital, la constance des réseaux moléculaires à l'harmonieuse fluidité des systèmes colloïdaux, et cependant, fait remarquable, le processus demeure intégralement réversible. Dans les cellules refroidies, plongées dans cet état d'indifférence et de stabilité qui caractérise le règne minéral, la vie reste à l'état latent et, lorsque la température s'élève, les délicates architectures du protoplasme se trouvent reconstituées, puis, sous l'impulsion de ce facteur mystérieux, reprennent le cycle de leurs transformations perpétuelles. Comment concevoir alors cette force abstraite qui n'existe pas sans structure et que la structure seule n'engendre pas, qui peut persister indéfiniment au fond d'une matière inerte et disloquée, mais qui peut également redonner à une silhouette cellulaire pétrifiée, l'élan prodigieux dont elle était pourvue ? Comment ne pas rester confondu devant l'étonnante souplesse de l'être vivant qui peut passer de la rigidité du solide à la merveilleuse et fascinante mobilité de l'activité vitale ? Comment ne pas réfléchir sur la signification de la mort cellulaire qui résulte de la perte de ce facteur catalytique, seul capable d'exploiter ses richesses structurales ? Cela est affaire de philosophes et nous ne voudrions pas avoir la prétention d'y apporter des idées neuves, mais il nous a paru indispensable de réfléchir quelques instants sur le fait que des organes d'animaux supérieurs puissent être conservés de manière indéfinie si l'on sait maintenir de façon constante une température suffisamment basse.

La tentation était grande, dès lors, d'essayer de suspendre l'activité d'un organisme entier, de plonger un être vivant supérieur dans une narcose sans fin, tout en conservant intacte cette prodigieuse faculté d'essor que représente la vie. Il ne s'agissait plus d'un simple ralentissement des fonctions métaboliques, analogue au sommeil de l'hypothermie ou de l'hibernation, mais bien d'un blocage absolu de l'ensemble des processus physiologiques. Cela peut paraître chimérique et il est certain que les premières expériences ont été décevantes. Cependant Smith [189, 190] a pu faire cristalliser plus de 50 % de l'eau corporelle d'un hamster, devenu rigide, dans un état complet de mort apparente, et malgré cela le faire revivre. Il n'est donc pas déraisonnable de penser qu'un jour prochain, l'expérience sera positive. Certains proclament pourtant très haut, qu'il

s'agit là d'un rêve utopique. La réponse appartient à l'avenir, mais il semble d'ores et déjà impertinent d'oser prétendre, dans le cadre de la Science moderne, que quelque chose est irréalisable, car l'Histoire est là pour nous prouver le contraire.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABADIE, P., CHARBONNIÈRE, R., GIDEL, A., GIRARD, P. et GUILBOT, A. 1953. L'eau dans la cristallisation du maltose et du glucose et états de l'eau de sorption de l'amidon d'après les spectres d'absorption en radio fréquence. *J. Chim. Phys.*, **50**, C47-C52.
2. ANDJUS, R. 1951. Sur la possibilité de ranimer le rat adulte refroidi jusqu'à proximité du point de congélation. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, 1591-1593.
3. BADINAND, A., FRANCILLON, J., GATE, A. et CAJCFINGER, M. 1957. Etude électrophorétique des protéines de la peau. Hypothèse de travail dans le domaine des homogreffes. *Sem. Hôp., Sup. Annal. Chir. Plast.*, Paris, **33**, 43-46.
4. BASSETT, A. L. 1956. Communication personnelle. New York.
5. BECQUEREL, P. 1950. La suspension de la vie des spores, des bactéries et des moisissures desséchées dans le vide vers le zéro absolu. Ses conséquences pour la dissémination et la conservation de la vie dans l'univers. *C. R. Acad. Sci.*, **231**, 1392-1394.
6. BECQUEREL, P. 1951. La suspension de la vie aux confins du zéro absolu entre 0,0075° K et 0,047° K. Rôle de la synérèse réversible cytonucléoplasmique. *Proc. 8th Intern. Congr. Refrig.*, 326.
7. BECQUEREL, P. 1952. La suspension de la vie aux confins du zéro absolu. *Scientia*, **87**, n° 485, 242-6.
8. BECQUEREL, P. 1953. La cryosynérèse cytonucléoplasmique et sa distinction de la plasmolyse, de la coagulation et de la solidification du protoplasma congelé. *C.R. Acad. Sci.*, **287**, 1473-1475.
9. BELEHRADEK, J. 1935. Temperature and living matter. *Protoplasma - Monographien* n° 8. Borntraeger. Berlin.
10. BERNAL, J. D. et FOWLER, R. H. 1933. *J. Chem. Phys.*, **1**, 515.
11. BILLINGHAM, R. E., 1954. The Preservation of Tissues, dans Biological Applications of Freezing and Drying. R. J. C. Harris éditeur, Acad. Press., N. Y., 252-283.
12. BILLINGHAM, R. E. 1954. The Storage of Skin, dans « The Preservation and Transplantation of Normal Tissues ». *Ciba Foundation Symposium*, J. et A. Churchill ed., Londres, 160-174.
13. BILLINGHAM, R. E. 1957. Communication personnelle. Londres.
14. BILLINGHAM, R. E. et MEDAWAR, P. B. 1951. The Technique of Free Skin Grafting in Mammals. *J. Exper. Biol. G. B.*, **28**, 385-402.
15. BILLINGHAM, R. E. et SPARROW, E. M. 1954. Studies on the Nature of Immunity to Homologous Grafted Skin, with Special Reference to the Use of Pure Epidermal Grafts. *J. Exper Biol., G. B.* **31**, 16-39.
16. BILLINGHAM, R. E. et SPARROW, E. M. 1955. The Effect of Prior Intravenous Injections of Dissociated Epidermal Cells and Blood on the Survival of Skin Homografts in Rabbit. *J. Embryol. Exper Morph.*, **3**, 265-285.
17. BORODIN, N. A. 1934. The Anabiosis or Phenomenon of Ressucitation of Fishes after Being Frozen. *Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool.*, **53**, 313-342.
18. BOYLE, R. 1683. [New Experiments and Observations Touching Cold, or an Experimental history of Cold, begun, 2nd ed, ed. for Richard Davis, book-seller in Oxford.

19. BRAUN, A. S. et AKYLBEKOV, K.-M. 1954. Influence d'une irradiation X préalable de l'hôte, au cours de greffes homoplastiques de peau chez le rat (en russe). *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **95** n° 6, 1351-1354.
20. BUCCIANTE, L. 1927. Sulla persistenza di manifestazioni vitali nelle culture *in vitro* a bassa temperatura. *Soc. Ital. Biol. Sper. Boll.*, **2**, 72-75.
21. BUCCIANTE, L. 1928-1929. Influenza di temperature molto basse su mitosi di culture *in vitro*. Formazione di cellule binucleate. *Protoplasma* **5**, 142-157.
22. BUCCIANTE, L. 1929. Resistenza dei tessuti di embrioni du pollo a temperature molto basse. *Monitore Zool. Ital.* **40**, 313-316.
23. BUCCIANTE, L. 1931. Durata di sopravvivenza dei tessuti esposti a basse temperature. A proposito di una comunicazione di Simonin, *Monitore Zool. Ital.* **42**, 243-244.
24. BUCCIANTE, L. 1931. Sopravvivenza dei tessuti embrionali di pollo mantenuti in liquido di Ringer a bassa temperatura, *Accad. Naz. Lincei. Roma. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Atti Rendic. Ser.*, **6**, **14**, 356-361.
25. BUCCIANTE, L. 1931. Sulla sopravvivenza alle basse temperature (fino a — 25°) dei vari tessuti di embrioni di pollo di cui fu interrotta l'incubazione, *Arch. Exper. Zellforsch.*, **11**, 397-423.
26. BURROUGHS MIDER G. et MORTON J. J. 1939. The effect of freezing *in vitro* on some transplantable mammalian tumors and on normal rat skin. *Am. J. Cancer*, **35**, 502-509.
27. BURROWS, M. T. 1910. The Cultivation of Tissues of the Chick-embryo outside the Body, *Am. Med. Assoc. J.*, **55**, 2057-2058.
28. BURTON, A. C. et EDHOLM, O. G. 1955. Man in Cold Environment. *Monographs of the Physiological Society*. Edward Arnold Ltd. ed., London.
29. CARREL, A. 1912. On the Permanent Life of Tissues outside of the Organism. *J. Exper. Med.*, **15**, 516-528.
30. CASTERMANS, A. 1956. Influence d'un « prétraitement » sur la tolérance observée aux homo-greffes de peau. *C. R. Soc. Biol.*, **150**, 1506-1509.
31. CHAMBERS, R. et HALE, H. P. 1932. The Formation of Ice in Protoplasm. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **110**, 336-352.
32. COHN, A. E. et MURRAY, H. A. 1925. Physiological Ontogeny. A. Chicken embryo. IV The Negative Acceleration of Growth with Age as demonstrated by Tissue Cultures. *J. Exper. Med.*, **42**, 275-290.
33. CONGDON, E. D. 1915. The Identification of Tissues in Artificial Cultures, *Anat. Rec.*, **9**, 343.
34. CONGDON, E. D. 1918-1919. The Embryonic Structure of Avian Heart Muscle with some Considerations regarding its Earliest Contraction. *Anat. Rec.*, **15**, 135-150.
35. DEANSLEY, R. 1954. Histological Evolution of Rat Gonadal Tissue transplanted after Freezing and Thawing, dans The Preservation and Transplantation of Normal Tissues. *Ciba Foundation Symposium*. J. et A. Churchill éditeur, Londres, 86-93.
36. DUNAL, F. 1848. Des effets de la gelée sur les plantes. *Mem. Ac. Montpellier. Sect. Sci.*, **1**, 153.
37. DUVAL, M. et PORTIER, P. 1922. Limite de résistance au froid des chenilles de Cossus Cossus. *C. R. Soc. Biol.*, **86**, 2-4.
38. EARLE, W. R. 1943. Production of Malignancy *in vitro*. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes seen in the Living Cells. *J. Nat. Cancer Inst.* **4**, 165.
39. EARLE, W. R. et EVANS, V. J. 1951. General Methods for Quantitative Studies on Cells in Tissue Culture. *Methods in Medical Research*, **4**, 217, *Year Book Publisher, Inc.*
40. FELL, H. B. 1953. Recent advances in Organ Culture. *Science Progress*, **162**, 212-231.
41. FELL, H. B. 1955. Communication personnelle. Cambridge, G. B.
42. FISCHER, A. 1946. Biology of Tissue Cells. University Press, ed., Cambridge, 1-348.
43. FISCHER, A. 1930. Gewebezuchtung. Müller et Steinicke, ed., Munich.
44. FISCHER, A. et PARKEK, R. C. 1929. The Occurrence of Mitoses in Normal and Malignant Tissues *in vitro*. *Brit. Journ. Exper. Path.*, **10**, 312.

45. FLOSDORF, E. W. 1949. Freezing and Drying. Reinhold Publish. Corp. ed. N. Y., 1-280.
46. FRANCILLON, J. et TRUCHET, P. 1953. Chirurgie plastique et cutanée, G. Doin, éditeur, Paris, 1-186.
47. FREYMAN-LIPSZYC, M. et FREYMAN, R. 1951. Absorption dans l'ultra-hertzien et liaison hydroxyle : eau de cristallisation et eau d'absorption. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, 401-403.
48. FREYMAN-LIPSZYC, M. et FREYMAN, R. 1951. Influence de la température sur l'absorption ultrahertzienne de l'eau de cristallisation et de l'eau d'adsorption (état liquide, vers — 90° C de l'eau adsorbée). *C. R. Acad. Sci.*, **232**, 1096-1098.
49. FRY, R. M. et GREAVES, R. I. N. 1951. The Survival of Bacteria during and after Drying. *J. Hyg.*, **49**, 220-246.
50. GAROFOLINI, L. 1927. Rhythmical contractions of single heart muscle cells in tissue culture *in vitro*. *J. Physiol. Proc.*, 63 : v-vi.
51. GERSH, I. et STEPHENSON, J. L. 1954. Freezing and Drying of Tissues for Morphological and Histochemical Studies, dans « Biological applications of Freezing and Drying ». R. J. C. Harris, éditeur, Acad. Press., N. Y., 329-384.
52. GEY, G. O. 1956. Film sur la pinocytose. *Am. Cancer Association*, Baltimore.
53. GEY, G. O. 1956. Communication personnelle, Baltimore, U. S. A.
54. GIBSON, G. E. et GIAUQUE, W. F. 1923. The third Law of Thermodynamics. Evidence from the specific Heats of Glycerol that Entropy of a Glass Exceeds that of a Crystal at the absolute Zero. *J. Am. Chem. Soc.*, **45**, 93-104.
55. GOLDSCHMIDT, J. HOFFMAN, R. et DOLJANSKI, J. 1937. Etude comparative sur la durée de la période de latence pour la croissance des tissus embryonnaires et adultes explantés *in vitro*, *C. R. Soc. Biol. Paris*, **126**, 389-392.
56. GONZALEZ, F. et LUYET, B. J. 1950. Resumption of Heart-Beat in Chick Embryo Frozen in Liquid Nitrogen, *Biodynamica*, **7**, 1-5.
57. GREAVES, R. I. N. 1954. Theoretical Aspects of Drying by Vacuum Sublimation, dans « Biological Applications of Freezing and Drying ». R. J. C. Harris, éditeur, Acad. Press., N. Y., 87-129.
58. GREAVES, R. I. N. 1956. The Preservation of Bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **2**, 365-371.
59. HAMILTON, H. L. 1952. Lillie's Development of the Chick, An Introduction to Embryology Henry Holt and C. N. Y., 1-624.
60. HARDIN, C. A. et WERDER, A. A. 1954. The Effect of Total Body Irradiation on the Survival of Homologous Skin Grafts on CFW Mice. *Plast. Reconstr. Surg.*, **13**.
61. HARMER, J. R. 1953. A specimen Holder for Low-Temperature Microscopy in Biology. *J. R. Micr. Soc.*, **73**, 128-133.
62. HEMPHILL, J. E. et BROWN, J. B. 1954. Skin Storage in Tissue-Banking. *Plast. Reconstr. Surg.*, **14**, 118-125.
63. HENAFF, F. 1952. La dessiccation des produits biologiques par sublimation de la glace. *Rev. Gén. Froid. Fr.*, **29**, 347-366.
64. HENAFF, F. 1958. Freeze-Drying and the Problem of Corneal Grafts. IInd International Symposium on Freezing and Drying. A. S. Parkes, éditeur, The Institute of Biology, Londres. Sous presse.
65. HERBERT, J. J. 1951. Homografts and the Bone-Bank. *J. Bone & Joint Surg.*, **33 B**, 316-322.
66. HESLOP, R. W., KROHN, P. L. et SPARROW, E. M. 1954. The Effect of Pregnancy on the Survival of Skin Homografts in Rabbits. *J. Endocrin.*, **10**, 325-332.
67. HIBUSE, Y. 1939. Experimental Studies on the Contractions of the Fragments of the Chicken embryonic Heart in Tissue Culture. I. II Sections. The Tissue Culture of the Auricular or Ventricular Fragments (I-IV reports). *Acta med. Nagasakiensa* **1**, 112-113, 149-150, 183-185 et 198-200 ; *Med. Assoc. Nagasaki J.*, **17**, 1772, 2207-2209, 2519-2521, et 2710-2711.
68. HIBUSE, Y. 1940. Experimental Studies on the Contractions of the Fragments of the Chicken Embryonic Heart in Tissue Culture. III. The side-by-side Tissue Culture of two or three Heart Fragments. *Med. Assoc. Nagasaki J.*, **18**, 194-208.

69. HOCART, R. et MONIER, J. C. 1949. Equipement d'observation aux basses températures, jusqu'à -100°C environ, pour microscope polarisant à réflexion, *Bull. Suisse Min. Pêr.*, **29**.
70. HOFFMAN, R. S., GOLDSCHMIDT, J. et DOLJANSKI, L. 1937. Comparative Studies on the Growth Capacity of Tissues from Embryonic and Adult Chickens. *Growth*, **1**, 228-233.
71. HOGUE, M. J. 1936. Studies of Heart Muscle in Tissue Cultures, *Anat. Rec.* **67**, 521-535.
72. HUFNAGEL, C. A. 1954. Experimental and Clinical Observations on the Transplantation of Blood Vessels, dans « Preservation and Transplantation of Normal Tissues ». *Ciba Foundation Symposium*, J. et A. Churchill, éditeur, Londres, 196-209.
73. HUNTER, J. : cf. PALMER, J. F.
74. HYATT, G. W., TURNER, T. C., BASSETT, C. A. L., PATE, J. W. et SAWYER, P. N. 1952. New Methods for Preserving Bone, Skin and Blood Vessels. *Postgrad. Med.*, **12**, 239-254.
75. HYATT, G. W. 1958. The Storage of Human Tissues—IInd International Symposium on Freezing and Drying. A. S. Parkes, éditeur, The Institute of Biology, Londres. Sous presse.
76. JACOBSON, W. 1955. Communication personnelle. Cambridge.
77. KALABUCHOV, N. 1934. Anabiosis in Vertebrates and Insects at a Temperature below Zero. *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, **1**, 424-426.
78. KAUZMANN, W. 1948. The Nature of the Glassy State and The Behavior of Liquids at Low Temperatures. *Chem. Rev.*, **43**, 219-256.
79. KEELEY, R. L. A., GOMEZ, A. C. et BROWN, I. W. 1952. An Experimental Study of the Effects of Freezing, Partial Dehydration and Ultra-rapid Cooling on the Survival of Dog Skin Grafts. *Plast. Reconstr. Surg.*, **9**, 330-344.
80. KIVILAAKSO, R. 1955. Changes in the Whole-Thickness Skin Graft Buried in Tissue. *Act. Orth. Scand. Suppl.* **18**, Helsinki.
81. KLEBS. 1893. *Ztschr. f. wiss. Zool.*, **55**, 265, cité par LUYET, B. J. (103).
82. KLINKE, J. 1939. Direct Proof that Cancer and Normal Cells Live after Freezing at Temperatures down to -25°C . *Growth*, **3**, 169-172.
83. KLINKE, J. 1939. Survival of Malignant and Normal Tissues after Exposure to -25°C . *Inter. Cancer Research Congress Atlantic City*, N. J., **3**, 192-193.
84. KREYBERG, L. 1948. The Development of Acute Tissue Damage due to Cold. *Arh. norske vidensk.-Akad. Oslo.*, **5**, 1-23.
85. KREYBERG, L. 1957. Local Freezing. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **147**, 546-547.
86. KREYBERG, L. et HANSSEN, O. 1950. Necrosis of whole Mouse Skin *in situ* and Survival of transplanted Epithelium after Freezing to -78°C . and -190°C . *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **2**, 168.
87. LEHRFELD, J. W., TAYLOR, A. C. et CONVERSE, J. M. 1955. Observations on second and third Set Skin Homografts in the Rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, **15**, 74-76.
88. LEVADITI, C. et MUTERMILCH, S. 1913. Contractilité des fragments de cœur d'embryon de poulet *in vitro*. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **74**, 426-464.
89. LEVI, G. 1924. Caractères morphologiques spécifiques et propriétés biologiques de différents tissus dans les cultures *in vitro*. *Bull. Assoc. Anat. C. R.* **19**, 204-217.
90. LEWIS, W. H. 1924. The Influence of Temperature on the Rhythm of the Isolated Heart of the young Chick Embryo. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, **35**, 252-257.
91. LEWIS, W. H. Cultivation of embryonic Heart-muscle. *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.* n° 90, **18**, 1-21, 1926.
92. LEWIS, W. H., 1929. The Effect of Various Solutions and Salts on the Pulsation Rate of Isolated Hearts from Young Chick Embryos. *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.* n° 115, **20**, 173-192.
93. LEWIS, W. H. et LEWIS, M. R. 1925. Cowdry. General Cytology, Chicago.
94. LOVELOCK, J. E. 1954. Biophysical Aspects of the Freezing of Living Cells, dans « Preservation and Transplantation of Normal Tissues ». *Ciba Foundation Symposium*, J. et A. Churchill, éditeur, Londres, 131-140.

95. LOVELOCK, J. E. et SMITH, A. U. 1956. Studies on Golden Hamsters during Cooling to and Rewarming from Body Temperatures below 0° C. III. Biophysical Aspects and general Discussion. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **145**, 427-442.
96. LUSENA, C. V. 1955. Ice Propagation in Systems of Biological Interest, III. Effect of Solutes on Nucleation and Growth of Ice Crystals. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **57**, 277-284.
97. LUSENA, C. V. et COOK, W. H. 1953. Ice Propagation in Systems of biological Interest. I. Effect of Membranes and Solutes in a Model Cell System. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **46**, 232-240.
98. LUSENA, C. V. et COOK, W. H. 1954. Ice Propagation in Systems of biological Interest. II. Effect of Solutes at rapid Cooling Rates. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **50**, 243-251.
99. LUYET, B. J. 1939. Water and the ultra-structure of Protoplasm. *Archiv. Exper. Zellforsch.*, **22**, 487-490.
100. LUYET, B. J. 1944. The Physical States Compatible with Life. *Colloïd Chem.*, **5**, 859-863.
101. LUYET, B. J. 1951. Survival of cells, Tissues and Organismes after ultra-rapid freezing, dans « Freezing and Drying. R. J. C. Harris », éditeur, The Institute of Biology, Londres 77-98.
102. LUYET, B. J. 1957. On the Growth of the Ice phase in aqueous Colloïds. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **147**, 434-451.
103. LUYET, B. J. 1958. On the Mechanism of Crystal Growth and on Vitrification and Devitrification in Aqueous Systems. IIInd International Symposium on Freezing and Drying. A. S. Parkes, éditeur. The Institute of Biology, Londres. Sous presse.
104. LUYET, B. J. et GEHENIO, P. M. 1940. Life and Death at Low Temperature. *Biodynamica*, Normandy, Missouri, 1-341.
105. LUYET, B. J. et GONZALEZ, F. 1950. Reprise des contractions rythmiques du muscle amniotique après congélation dans l'azote liquide. *C. R. Acad. Sci.*, **230**, 2331-2333.
106. LUYET, B. J. et GONZALEZ, F. 1951. Survival of Cells in Embryonic Heart of Chick after Freezing. *Biodynamica*, **7**, 61-66.
107. LUYET, B. J. et GONZALEZ, F. 1952. Protective action of Glycerol against Freezing Injury in Embryonic Tissues of Chick. *Biodynamica*, n° 137, 101-106.
108. MAXIMOW, A. 1929. Über die Entwicklung argyrophiler und Kollagener Fasern in Kulturen von erwachsenem Säugetiergewebe (Nach des Verfassers Tode geschrieben und veröffentlicht von W. Bloom). *Zischr. f. mikr. anat. Forsch* **17**, 625.
109. MAYEHARA, Y. I., 1929. On the simultaneous Contraction of the separate Fragments of Chicken Embryo Heart *in vitro*, and the rhythmical Contraction of the fragments of digestional Organs and Gall-bladders of Embryos. *Soc. Path. Japon. Acta*, **19**, 259-262.
110. MEDAWAR, P. B. 1937. A Factor inhibiting the Growth of Mesenchyme. *Quart. J. Exper. Physiol.*, **27**, 147.
111. MEDAWAR, P. B. 1940. The Growth, Growth Energy, and Ageing of the Chicken's Heart. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **129**, 332-355.
112. MEDAWAR, P. B. 1944. The Behaviour and Fate of Skin Autografts and Skin Homografts in Rabbits. *J. Anat. Londres*, **78**, 176.
113. MEDAWAR, P. B. et SPARROW, E. M. 1956. The Effects of Adrenocortical Hormones, Adrenocorticotrophic Hormone and Pregnancy on Skin Transplantation Immunity in Mice. *J. Endocrinol.*, **14**, 240-256.
114. MERYMAN, H. T. 1955. The Study of Frozen Specimens. Ice Crystals and Ice Crystals Growth by electron Microscopy. U. S. Naval Med. Res. Inst. Project NM 000.018.01.09, **13**, 529-544.
115. MERYMAN, H. T. 1957. Physical Limitations of the Rapid Freezing Methods. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **147**, 452-459.
116. MERYMAN, H. T. 1958. The Mechanisms of Freezing in Biological Systems. IIInd International Symposium on Freezing and Drying. A. S. Parkes, éditeur, The Institute of Biology, Londres. Sous presse.
117. MERYMAN, H. T. 1958. Communication personnelle. Paris.

118. MERYMAN, H. T. et KAFIG, E. 1955. The Freezing and Thawing of whole Blood, U. S. Naval Medical Institute, 13, Project NM 000 018. 01.10., 953-964.
119. MEYER, R. cité par EPHRUSSI, B. 1932. La culture des tissus. Gauthier-Villars, ed., Paris, 1-233.
120. MORAN, T. 1926. The Freezing of Gelatine Gel. *Proc. Roy. Soc. (London) A.*, **112**, 30-46.
121. MORGAN, J. F. GUERIN, L. F. et MORTON, H. J. 1956. The Effect of Low Temperature and Storage on the Viability and Mouse Strain Specificity of Ascitic Tumor Cells. *Cancer Research*, **16**, 907-911.
122. MOSNIER, J. 1952. Communication personnelle.
123. MURRAY, M. R. 1951. Dans « Methods in Medical Research », 4, Year Book Publishers. Chicago, 211-212.
124. MURRAY, M. R. Cours de culture de tissus. New York University.
125. NEGOVSKI, V. 1957. XV^e Congrès Inter. Med. et Pharm. Milit. Belgrade.
126. ODA, S. et KAMON, H. 1927-1928. Über den Einfluss einiger Salze auf das Wachstum der Kultivierten Herzkammer und Milzstückchen vom Hühnerembryo *in vitro*. *Folia Pharmacol. Japon.*, **6**, 8, 166.
127. OLIVO, O. M. 1924. Sull'inizio della capacità funzionale dei tessuti contrattili nell'embrione di pollo in relazione alla loro differenziazione strutturale e morfologica : I. Differenziazione funzionale e morfologica dell'abbozzo cardiaco. *Accad. Naz. Lincei, Roma, Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. Atti e Rendic. Ser. 5*, **33**, 209-212.
128. OLIVO, O. M. 1926. Les caractères cytologiques des myoblastes d'embryon de poulet cultivés *in vitro* pendant quatorze mois. *Bull. Assoc. Anat. C. R.*, **21**, 445-459.
129. OLIVO, O. M. 1928. Differenziazione istologica ottenuta *in vitro* del cuore di pollo indifferenziato. *Soc. Ital. Biol. Sper. Boll.*, **3**, 9-12.
130. OLIVO, O. M. 1928. Détermination précoce de l'ébauche du cœur dans l'embryon de poulet et sa différenciation histologique et physiologique *in vitro*. *Assoc. Anatomistes Bull. C. R.*, **23**, 357-374.
131. OLIVO, O. M. 1929. Sulle modificazioni strutturali et funzionali del miocardio di pollo coltivato *in vitro*. *Arch. exper. Zellforsch.*, **8**, 250-290.
132. OLIVO, O. M. 1930. *W. Roux Arch. Entw. Mech. Organ.*, **121**, 408.
133. OLIVO, O. M. 1930. Differenziazione *in vitro* di Fibre collagene. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **5**, 109-111.
134. OLIVO, O. M. 1930. Experiments on the Differentiation and Growth of the cardiac Tissue in Chicken Embryos (Discussion p. 83). *World's Poultry Congr., London, Rep. Proc. Sec. A*, **4**, 78-83, 1931.
135. OLIVO, O. M. et LORENZI, E. 1928. Su la durata dell'intercinesi nelle cellule coltivate *in vitro*. *Rendiconto della R. Accademia nazionale dei Lincei*, 7/sér., **6**, 1^{er} sem., fasc. 11, 936.
136. OLIVO, O. M. et SLAVICH, 1930. Ricerche sulla velocità di accrescimento delle cellule e degli organi. II. Coefficiento mitotico dell'accrescimento negli espianti di cuore di pollo coltivati *in vitro*. *Wilhelm Roux. Arch. Entw. Mech. Organ.*, **121**, 408-429.
137. PAFF, G. H. 1935. Conclusive evidence for sino-atrial Dominance in isolated 48-hours Embryonic Chick Hearts Cultivated *in vitro*. *Anat. Rec.* **63**, 203-210.
138. PALMER, J. F. 1835. The Works of John Hunter, F.R.S., with notes. Longmans, ed., London.
139. PAREZ, M., VANHAECHE, Y. et TABARY. 1953. Congélation à — 79° C des spermatozoïdes de bovins. *Elevage et Insémination*, **18**, 1-5.
140. PARKER, R. C. 1956. Communication personnelle. Toronto, Canada.
141. PARKER, R. C. 1957. Nutrition and Metabolism of Animal Tissue Cultures. Discussion of the paper of Waymouth, Ch.. The Decennial Review Conference on Tissue Culture, *J. Nat. Cancer Inst.*, **19**, n° 4, 503-506.
142. PARKES, A. S. 1957. Viability of ovarian Tissue after Freezing. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **147**, 520-528.

143. PARKES, A. S. 1958. Freeze-drying of viable Grafts: Problems and Possibilities. IIInd Inter. Symposium on Freezing and Drying. A. S. Parkes, éditeur, The Institute of Biology, Londres. Sous presse.
144. PASCAL, P. 1953. Notions élémentaires de Chimie générale. Masson et Cie, ed., Paris, 1-550.
145. PATTEN, B. M. et KRAMER, T. C. 1933. The Initiation of Contraction in the Embryonic Chick Heart. *Am. J. Anat.*, **53**, 349-375.
146. DU PETIT THOUARS, A. 1817. Sur les effets de la gelée sur les plantes. *Verger Français*, Paris.
147. Mc PHERSON, S. D., DRAHEIM, J. W., EVANS, V. J. et EARLE, W. R. 1956. The Viability of fresh and frozen Corneas. *Am. J. Ophthalm.* **41**, 513-519.
148. PICTET, R., et YUNG, E. 1884. De l'action du froid sur les microbes. *C. R. Acad. Sci.*, **98**, 747-749.
149. PLATEAU, F. 1872. Recherches physico-chimiques sur les articulés aquatiques. *Bull. Acad. roy. de Belgique*, 2^e série, **34**, 291-309.
150. POLGE, C. 1951. Functional survival of Fowl Spermatozoa after Freezing at — 79° C. *Nature* **167**, 949-950.
151. POLGE, C. et LOVELOCK, J. E. 1952. Preservation of Bull Semen at — 79° C. *Vet. Record.*, **64**, 396-97.
152. POLGE, C. et PARKES, A. S. 1952. Possibilities of Long-term Storage of spermatozoa at Low Temperatures. *Animal Breed Abstr.*, **20**, 1-5.
153. POLGE, C. et ROWSON, L. E. A. 1952. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at — 79° C. *Nature*, **169**, 626-627.
154. POLGE, C. et ROWSON, L. E. A. 1952. Results with Bull Semen stored at — 79° C. *Vet. Record.*, **64**, 851.
155. POLGE, C., SMITH, A. U. et PARKES, A. S. 1949. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, **164**, 666.
156. POLGE, C. et SOLTYS, M. A. 1958. The Preservation of Trypanosomes by Freezing. IIInd Inter. Symposium on Freezing and Drying. A. S. Parkes, ed., the Institute of Biology, Londres. Sous presse.
157. POLICARD, A. 1950. Précis d'histologie physiologique. 5^e éd., G. Doin, ed. Paris, 1-858.
158. POMERAT, C. M., DRAGER, G. A. et PAINTER, J. T. 1946. Effect of some Barbiturates on Tissues *in vitro*. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **63**, 322.
159. POMERAT, C. M. et LEAKE, C. D. 1954. Short Term Cultures for Drug Assays : General Considerations, *An. N. Y., Acad. Sci.*, **58**, 1110-1128.
160. POUCHET, F. A. 1866. Recherches expérimentales sur la congélation des animaux. *J. Anat. et Physiol.* **3**, 1-36.
161. PREHN, R. T. et MAIN, J. M. 1956. The Influence of Sex on isologous Skin Grafting in the Mouse. *J. Nation. Cancer Inst.*, **17**, 35-36.
162. PRYDE, J. A. et JONES, G. O. 1952. Properties of vitreous water. *Nature*, Londres. **170**, 685-688.
163. DE QUATREFAGES, A. 1853. Recherches sur la vitalité de quelques poissons d'eau douce. *Ann. Sci. Nat.* (3), **19**, 341-369.
164. REAUMUR, R. A. F. 1736. Mémoires pour servir à l'histoire des Insectes, Paris, 2, 141-147.
165. DE RENYI, G. S. et HOGUE, M. J. 1937-1938. Studies on Cardiac Muscle Cells, from Chick Embryos, grown in Tissue Culture. *Anat. Rec.*, **70**, 441-449.
166. REY, L. R. 1957. Dispositif pour l'examen microscopique aux basses températures. *Experientia*, **13**, 201-202, et 55^e Exposition Internationale des Instrument : de Physique (Paris, 1958. Grand Palais, Stand du CNRS). Exposition Internationale de Bruxelles. Pavillon de France (Stand du CNRS).
167. REY, L. R. 1957. Regards sur les applications biologiques des basses températures : banque des tissus et produits naturels lyophilisés. *Bull. Inst. Inter. Froid. Paris*, **37**, n° 5, 1115-1149.

168. REY, L. R. 1957. Studies on the Action of Liquid Nitrogen on Cultures *in vitro* of Fibroblasts. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **147**, 460-466.
169. REY, L. R. 1957. Le Problème de la Banque de Tissus. *Rev. Quest. Sci. Fr.* **18**, 541-555.
170. REY, L. R. 1958. Study of the Freezing and Drying of Tissues at Very Low Temperatures. IInd International Symposium on Freezing and Drying, A. S. Parkes, éditeur, The Institute of Biology, Londres. Sous presse.
171. REY, L. R. 1958. Physiologie du cœur de l'embryon de poulet *in vitro*, après congélation à très basse température. *J. Embryol. exper. Morph.*, **6**, 1, 171-177.
172. REY, L. R. 1959. Traité de Lyophilisation. Hermann. Paris. Sous presse.
173. REY-DHAUSSY, M. et REY, L. R. 1957. Propagation de la cristallisation dans l'eau de surfusion. *J. Chim. Phys.*, **54**, 146-148.
174. ROMANOFF, A. L., 1929. Study of the Heart Beat of Chick Embryo. *Poultry Sc.* **8**, 298-300.
175. ROSTAND, J. 1946. La glycérine et la résistance du sperme aux basses températures. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, 2310-2312.
176. SACHAROV, N. 1930. Studies in Cold Resistance in Insects. *Ecology*, **11**, 505-517.
177. SANFORD, K. K., EARLE, W. R. et LIKELY, G. D. 1948. The Growth *in vitro* of single isolated Tissue Cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, **9**, 229-246.
178. SCHAFER, P. 1956. Sexualhormone und Hautverpflanzung. *Arch. Klin. Exper. Dermatol. Dtsch.*, **202**, 590-603.
179. SCHAFER, P. 1957. Über die Hautverpflanzung zwischen verschiedengeschlechtlichen Transplantations partnern. *Arch. Klin. Exper. Dermatol. Dtsch.* **204**, 159-164.
180. SCHENK, S. L. 1870. Über den Einfluss niederer Temperaturgrade auf einige Elementarorganismen. *Sitzungsb. Wien. Akad.*, **60**, 25-30.
181. SCHERER W. F. et HOOGASIAN A. C. 1954, Preservation at subzero temperatures of Mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa), *Proc. Soc. for Exp. Biol. & Med.*, **87**, 480-486.
182. SCOTTHORNE, R. J. The effect of Cortisone Acetate on the Response of the Regional Lymph Node to a skin Homograft. *J. Anat.*, **90**, 417-427, 1956.
183. SEGUR, J. B. 1953. dans *Glycerol*, C. S. Miner. ed., Reinhold Publishing Corps., N. Y., 238-334.
184. SHERMAN, J. K. 1957. Freezing and Freeze-Drying of Bull Spermatozoa. *Am. J. of Physiol.*, **190**, 281-286.
185. SIMON, F. E. 1931. *Z. Anorg. Allgem. Chem.* 203-219., cité par PRYDE and JONES (162).
186. SKOOG, T. 1954. An Experimental and Clinical Investigation of the Effect of Low Temperature on the Viability of Excised Skin. *Plast. Reconstr. Surg.*, **14**, 403-416.
187. SLOVITER, cité par SMITH, A. U. (188).
188. SMITH, A. U. 1954. Effects of low Temperatures on Living Cells and Tissues, dans « Biological Applications of Freezing and Drying », R. J. C. Harris, éditeur, Acad. Press. N. Y., 1-62.
189. SMITH, A. U. 1956. Studies on golden Hamsters during Cooling to and Rewarming from Body Temperatures below 0° C. I. Observations during Chilling Freezing and Supercooling. *Proc. Roy. Soc. (London) B.*, **145**, 391-407.
190. SMITH, A. U. 1956. Studies on golden hamsters during Cooling to and Rewarming from Body Temperatures below 0° C. II. Observations during and after Ressucitation. *Proc. Roy. Soc. (London) B.* **145**, 407-426.
191. SMITH, A. U. et PARKES, A. S. 1952. Preservation of Ovarian Tissue at low temperatures. *Lancet*, **II**, 570-572.
192. SMITH, A. U. et PARKES, A. S. 1954. Storage and Homografting of Endocrine Tissues, dans « Preservation and Transplantation of Normal Tissues ». *Ciba Foundation Symposium*, J. et A. Churchill, éditeur. Londres, 76-85.
193. SMITH, A. U. et POLGE, C. 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, **166**, 668-669.

194. SMITH, A. U., POLGE, C. et SMILES, J. 1951. Microscopic Observation of Living Cells during Freezing and Thawing. *J. R., Micr. Soc.*, **71**, 186-195.
195. SMITH, A. U. et SMILES, J. 1953. IX Microscopic studies of Mammalian Tissues during Cooling to and Rewarming from — 79° C. *J. Roy. Micr. Soc.*, **73**, 134-139.
196. SPALLANZANI, L. 1776. Opuscoli di fisica animale e vegetale. Modena, 1, Chap. V et VI.
197. STILWELL, E. F. 1937-1938. Cytological study of Chick Heart Muscle in Tissue Cultures. *Anat. Rec. Suppl.*, **70**, 130.
198. STILWELL, E. F. 1946. A comparison of Growth, Differentiation, Activity and Action Currents of Heart and Skeletal Muscle in Tissue Culture. *Anat. Rec.* **95**, 125-146.
199. SUZUKI, Y. 1925-1926. A Study of the Resistance of Animals by the Tissue-Culture Methods. The relation of the age of Chicken Tissue, to the influence of diphtheria toxin ; also the rhythmic Contraction of the Heart Muscle. *Mitt. Allgem. Path. und path. An., Sendai*, **2**, 191-222.
200. TAMMANN, G. 1925. The States of Aggregation. Von Nostrand, ed. N. Y.
201. TAMMANN, G. et BUCHNER, A. 1935. *Zeitschr. f. anorg. allg. chem.*, **222**, 12., cité par LUYET, B. J. (103).
202. TAYLOR, A. C. 1949. Survival of Rat Skin and Changes in Hair Pigmentation following Freezing. *J. Exper. Zool.* **110**, 77-112.
203. TAYLOR, A. C. 1957. Communication personnelle. Londres.
204. TAYLOR, A. C. et GERSTNER, R. 1955. Tissue Survival after Exposure to Low Temperatures and the effectiveness of protective pretreatments. I. Evolution by growth in tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **46**, 477-502.
205. TAYLOR, A. C., GERSTNER, R. et CONVERSE, J. M. 1956, Preservation of Skin grafts by Refrigeration for Reconstructive Surgery. *Plast. Reconstr. Surg.*, **18**, 275-285.
206. TAYLOR, A. C. et LEHRFELD, J. W. 1953. Determination of survival Time of Skin Homografts in the Rat by Observation of Vascular Changes in the Graft. *Plast. Reconstr. Surg.*, **12**, 423-431.
207. THOMSON, D. 1914. Some further Researches on the Cultivation of Cells *in vitro*. *Proc. R. Soc. Med.*, **7** : Marcus Beck Lab. Reps. (2). 15.
208. VOLMER, M. 1939. Kinetik der Phasenbildung. Dresden.
209. VUILLARD, G. 1957. Contribution à l'étude de l'état vitreux et de la cristallisation des solutions aqueuses. Thèse, Masson et Cie, Paris 1-65.
210. VUILLARD, G. 1957. Communication personnelle. Paris.
211. WALTHER, A. 1862. Beiträge zur Lehre von der thierischen Wärme. *Virchow's Arch.*, **25**, 414-417.
212. WALTON, J. H. et JUDD, R. C. 1914. *J. Phys. Chem.*, **18**, 222, cité par LUYET, B. J. (103).
213. WEBSTER, J. P. 1944. *Ann. Surg.*, **120**, 431.
214. WERDER, A. A. et HARDIN, C. A. 1954. The effects of Splenectomy on the Survival Rate of homologous Skin grafts, in CFW Mice. *Surgery*, Saint-Louis, U. S. A., **35**, n° 3, 405-410.
215. WOLFF, E. 1954. Titres et Travaux Scientifiques. Les dernières Nouvelles, Strasbourg, 1-84.
216. WOLFF, E. et HAFEN, K. 1952. Sur une technique permettant la culture *in vitro* des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **234**, 1396-1398.
217. WOODRUFF, M. F. A. et SIMPSON, L. O. 1955. Experimental Skin Grafting in Rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, **15**, 451-458.

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

L'IMMUNITÉ DE TRANSPLANTATION

Vu et approuvé :

Paris, le 29 juin 1958.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

ÉDITIONS SCIENTIFIQUES HERMANN
NUMÉRO D'ÉDITION : 2059
IMPRIMERIE LA SEMEUSE, ÉTAMPES
DÉPOT LÉGAL : N° 495 1^{er} TRIMESTRE 1960

